

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**DETERMINANTES DE VIRULENCIA EN
ENTEROCOCOS ASOCIADOS A PATOLOGÍAS
HUMANAS: DIFERENCIAS FENOTÍPICAS Y
MOLECULARES ENTRE AISLADOS MARINOS Y
CLÍNICOS**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

AUTOR

Favio Dénnis Rojas Chávez

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

DETERMINANTES DE VIRULENCIA EN ENTEROCOCOS
ASOCIADOS A PATOLOGÍAS HUMANAS: DIFERENCIAS
FENOTÍPICAS Y MOLECULARES ENTRE AISLADOS
MARINOS Y CLÍNICOS

Tesis para optar el Título de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo

Bach. FAVIO DÉNNIS ROJAS CHÁVEZ

Asesora: MgSc. DÉBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE

Lima-Perú

2014

DEDICATORIA

*Al Mayor PNP(R) Favio Rojas, mi padre... un hombre íntegro,
que ante lo adverso siempre encontró una razón para no
detenerse; y a mi adorada mamá Elsa... mi heroína.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer estas líneas algo personales, y mencionar primero a Dios, cuyo nombre es Jehová, del cual soy muy creyente. Él me ha enseñado a ser perseverante, a buscar la verdad y ser objetivo, aun cuando el camino de la ciencia a veces entra en contradicciones con la fe.

Alcanzar este momento en mi vida es el resultado del apoyo de mi adorada familia, a quien expreso mi más profunda gratitud por su sacrificio y esfuerzo: mis padres Favio y Elsa, principales impulsores de mis sueños; también de mis hermanos Diana, Ignacio y Lidia; mis abuelitos Cirilo y Saturnino, mis tíos: Fredy, Gumercinda, José, Julián, y la lista sigue...

También deseo agradecer a mi maestra y asesora Mg. Débora Alvarado Iparraguirre, una notable maestra y tenaz investigadora. Gracias por confiar en mí y darme miles de oportunidades, aun cuando por un momento me parecía que no concluiría con esta tesis.

De igual forma les agradezco a mis maestros y compañeros del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la UNMSM; mis maestros: Dr. Pablo Ramírez y Mg. Ruth García; y mis amigos: Armando, Tito, Fernando, Carlos, Abrahán, Chen, Yerson y particularmente a Melina quien me brindó muchísima ayuda; de igual forma mi agradecimiento al Dr. Rafael Ramírez, médico del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen de ESSALUD.

Gracias también mis profesores de la Escuela de Microbiología y Parasitología: Libertad Alzamora, Erasmo Colona y Jorge León por apoyarme con el uso de algunos materiales y equipos fundamentales en el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer también al Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM por su apoyo en el financiamiento de parte de mi tesis mediante el fondo destinado al Concurso de tesis, del cual salí beneficiado y también mediante el programa de Proyectos multidisciplinarios en medio ambiente y cambio climático, del área de conservación y valoración de la biodiversidad; del cual esta tesis también es parte del proyecto: “Estudio genético-molecular de factores de virulencia y resistencia a vancomicina de *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* y otros asociados a infecciones humanas, de origen clínico y del mar; implicancia sobre la microflora autóctona en ambientes altamente impactados por residuos urbanos”.

En una línea aparte quiero agradecerte a ti Nancy, mi novia, por todo el ánimo y la fuerza que me has brindando en estos dos años, siempre haciéndome sonreír aún hoy, y recitándome esa sencilla pero significativa frase: “...respira hondo y sigue”.

ABREVIATURAS

ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAL	Bacterias ácido lácticas
BVNC	Bacteria Viable no cultivable
DO	Densidad Óptica
EDTA	Etilendiamina- <i>N,N,N',N'</i> -ácido tetra acético
ESP	Proteína de superficie enterocócica (<i>Enterococcal superficial protein</i>)
ER	Enterococos resistentes
ERE	Enterococos resistentes a Eritromicina
EVR	Enterococos Vancomicina-resistentes
ITU	Infecciones del tracto urinario
Mb	Mega-bases
ORF	Marco de lectura abierta (<i>Open reading frame</i>)
PAI	Isla de patogenicidad (<i>Pathogenicity island</i>)
PBS	Buffer fosfato salino (phosphate buffer saline)
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual
PMN	Granulocitos polimorfonucleares
RPM	Revoluciones por minuto
TGI	Tracto gastrointestinal
TGU	Tracto genitourinario
UFC	Unidades formadoras de colonias
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos

BH: Betahemólisis; Bp: Biopelícula: + (moderada) ++ (fuerte); GEL: gelatinasa; G+C: porcentaje guanina - citosina; w/v: relación peso/volumen

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
- DEDICATORIA	i
- AGRADECIMIENTOS	ii
- ABREVIATURAS	iv
- INDICE GENERAL	v
- ÍNDICE DE TABLAS	vii
- ÍNDICE DE FIGURAS	ix
- RESUMEN	x
- ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. El Género <i>Enterococcus</i> : Taxonomía y Fisiología	4
2.2. El Género <i>Enterococcus</i> : Aspectos ecológicos	7
2.2.1. <i>Enterococcus</i> en ambientes marinos y aguas residuales	8
2.3. El Género <i>Enterococcus</i> : Aspectos Genéticos	10
2.4. <i>Enterococcus</i> y patología asociada	12
2.4.1. Endocarditis	12
2.4.2. Infección del tracto urinario (ITU)	12
2.4.3. Bacteriemias	13
2.4.4. Infecciones intraabdominales y pélvicas	14
2.4.5. Otras infecciones enterocócicas	14
2.5. <i>Enterococcus</i> y su resistencia a la terapia antibiótica	15
2.5.1. Determinantes de Virulencia en <i>Enterococcus</i>	16
2.5.1.1. Proteína de superficie enterocócica (ESP)	16
2.5.1.2. Hemolisina	19
2.5.1.3. Gelatinasa enterocócica	22

	Pág.
2.5.1.4. Hialuronidasa enterocócica	23
2.5.2. Modelos experimentales usados para evaluar la virulencia	25
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	27
3.1. Objetivos	27
3.2. Hipótesis	27
3.2.1. Variables de la investigación	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Materiales	28
4.2. Métodos	33
4.2.1. Selección, identificación y reactivación de cepas	33
4.2.2. Determinación de los antibiotipos de resistencia	33
4.2.3. Ensayos fenotípicos de virulencia	34
4.2.3.1. Determinación de la actividad gelatinasa	34
4.2.3.2. Determinación de la actividad hemolítica	35
4.2.3.3. Determinación de la formación de biopelículas <i>in vitro</i>	35
4.2.4. Ensayos moleculares de virulencia	37
4.2.4.1. Extracción del DNA total	37
4.2.4.2. Estandarización del PCR múltiplex	37
4.2.5. Ensayos de mortalidad de <i>Galleria mellonella</i>	38
4.2.5.1. Estimación de la concentración del patógeno	38
4.2.5.2. Determinación de la dosis infectiva	39
4.2.6. Análisis estadístico	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Selección de cepas y perfiles de resistencia antimicrobiana	41
5.2. Ensayos fenotípicos de virulencia	46
5.2.1. Determinación de la actividad gelatinasa	46
5.2.2. Determinación de la actividad hemolítica	49

	Pág.
5.2.3. Formación de biopelículas <i>in vitro</i>	51
5.3. Ensayos moleculares de virulencia	55
5.4. Ensayo de mortalidad en <i>G. mellonella</i>	61
6. DISCUSIÓN	72
6.1. Resistencia antimicrobiana	72
6.2. Determinantes de virulencia	76
6.3. Ensayos de mortalidad en <i>G. mellonella</i>	86
7. CONCLUSIONES	94
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9. ANEXOS	118

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Grupos de especies principales en el género <i>Enterococcus</i>	6
Tabla 2. Estrategias de patogenicidad y virulencia en <i>Enterococcus</i>	24
Tabla 3. Cepas marinas empleadas en esta investigación	30
Tabla 4. Cepas clínicas empleadas en esta investigación	31
Tabla 5. Cepas patrón y de referencia usadas en esta investigación	32
Tabla 6. Perfiles de resistencia antimicrobiana	43
Tabla 7. Resistencia antimicrobiana: enterococos marinos	44
Tabla 8. Resistencia antimicrobiana: enterococos clínicos	44
Tabla 9. Resistencia antimicrobiana: por origen de la infección	45
Tabla 10. Actividad gelatinasa relativa. Análisis por cepa	47
Tabla 11. Actividad gelatinasa relativa: análisis estadístico por grupos	47
Tabla 12. Actividad hemolítica: enterococos marinos	50
Tabla 13. Actividad hemolítica: enterococos clínicos	50
Tabla 14. Tipificación de biopelículas: enterococos marinos	54
Tabla 15. Tipificación de biopelículas: enterococos clínicos	54
Tabla 16. Perfil molecular de virulencia: enterococos marinos	56
Tabla 17. Perfil molecular de virulencia: enterococos clínicos	56
Tabla 18. Tabla de contingencia: Marcadores vs. Tipo de biopelícula	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura1. Representación de las proteínas de superficie ESP y Bap	18
Figura 2. Modelo de la expresión de la hemolisina en <i>E. faecalis</i>	21
Figura 3. Gelatinasa enterocócica: actividad relativa	48
Figura 4. Gelatinasa enterocócica: distribución de la actividad por origen	48
Figura 5. Formación de biopelículas: efecto de la concentración de glucosa	52
Figura 6. Formación de biopelículas en <i>E. faecalis</i> por perfiles de virulencia	58
Figura 7. Formación de biopelículas en <i>E. faecium</i> por perfiles de virulencia	59
Figura 8. Virulencia de enterococos marinos (perfil <i>esp</i> ⁺)	65
Figura 9. Virulencia de enterococos marinos (perfil <i>gelE</i> ⁺)	65
Figura 10. Virulencia de enterococos marinos (perfil: sin marcadores)	66
Figura 11. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: <i>cylA</i> ⁺ / <i>esp</i> ⁺ / <i>gelE</i> ⁺)	66
Figura 12. Virulencia de enterococos clínicos (perfiles: <i>cylA</i> ⁺ ; <i>cylA</i> ⁺ / <i>gelE</i> ⁺)	67
Figura 13. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: <i>esp</i> ⁺ / <i>hyl</i> ⁺)	67
Figura 14. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: <i>gelE</i> ⁺)	68
Figura 15. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: <i>esp</i> ⁺ ; <i>esp</i> ⁺ / <i>gelE</i> ⁺)	68
Figura 16. Comparación de la letalidad de los marcadores <i>cylA</i> ⁺ , <i>esp</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺	69
Figura 17. Comparación de la letalidad de los marcadores <i>gelE</i> ⁺	69
Figura 18. Comparación de la letalidad de <i>E. faecium</i> (perfil <i>esp</i> ⁺ / <i>gelE</i> ⁺)	70
Figura 19. Letalidad de enterococos: <i>E. hirae</i> ; <i>E. avium</i>	70
Figura 20. Letalidad de enterococos: <i>E. durans</i> ; <i>E. raffinosus</i>	71

RESUMEN

Los enterococos, considerados patógenos emergentes, presentan una gran versatilidad genética actuando en el medio ambiente como reservorios genéticos de virulencia y resistencia. Se determinó comparativamente en 33 cepas de enterococos clínicos y 34 cepas de origen marino los perfiles de resistencia antimicrobiana, perfil fenotípico y la presencia de los marcadores de virulencia *gelE*, *cylA*, *esp* y *hyl*, relacionados respectivamente con: la gelatinasa, hemolisina, la proteína de superficie enterocócica y una putativa glicosil-hidrolasa; además se realizaron ensayos de mortalidad en el modelo experimental *Galleria mellonella* (Orden: *Lepidoptera*).

Se determinó en cepas marinas sólo la presencia de *gelE* y *esp*, con una expresión fenotípica fuerte de biopelículas en casi todas las cepas, aunque no se demostró asociación con estos marcadores. Sólo el 14.3% de enterococos *gelE*⁺ presentó actividad gelatinasa y ninguna cepa resultó ser betahemolítica ni portar *cylA* (Activador de la hemolisina). En el grupo clínico se observó múltiples antibiotipos y perfiles de virulencia en relación directa a la especie y al origen de la infección. El marcador *hyl* estaba presente sólo en cepas resistentes a vancomicina (EVR) y portadoras de *esp*, además se detectó en este grupo cepas betahemolíticas (12.1%) y portadoras de *cylA* (15.2%) mientras que el 48.5% presentaron *gelE* y la actividad gelatinasa fue detectada en un 30.3% de la cepas.

Las cepas clínicas con actividad gelatinasa y hemolisina positivas desarrollaron una alta mortandad en *G. mellonella*, en tanto una cepa de *E. faecalis* de origen marino (gelatinasa positiva) presentó una mortandad similar al grupo clínico. Se determinó que los enterococos marinos, principalmente *E. faecalis*, conservan ciertas características de virulencia y de resistencia antimicrobiana por lo que su persistencia en el ambiente marino representa una amenaza potencial a la salud pública

Palabras clave: Virulencia, enterococo, multiresistencia, patogenicidad, *G. mellonella*

ABSTRACT

Enterococci are emerging pathogens, retaining virulence and antimicrobial resistance genes in marine environmental. antimicrobial resistance profiles, phenotype profile and presence of virulence markers were compared in 33 clinical isolates and 34 marine strains. Virulence markets *gelE*, *CylA*, *esp* and *hyl*, these respectively are gelatinase, hemolysin, enterococcal surface protein, and putative glycosyl-hydrolase; besides mortality trials were conducted in the experimental model *Galleria mellonella* (Order: Lepidoptera).

Was found only in marine enterococci the presence of *gelE* and *esp*, with strong biofilms in almost all strains, no association showed with these markers. Only 14.3% of enterococci *gelE*⁺ and gelatinase activity showed no strain proved beta hemolytic or carry *cylA* (hemolysin activator). In the clinical group multiple virulence antibiotypes and profiles related to the species and origin of infection was observed, *hyl* marker was present only in strains vancomycin resistance (VRE) and *esp*-positives, also detected in this group, beta-hemolytic (12.1%) and strains carrier *cylA* (15.2%), in addition 48.5% of clinical enterococci are *gelE* and gelatinase activity was detected in 30.3% of the strains.

Gelatinase positive isolates and hemolysin developed a high mortality in *G. mellonella*, a strain of *E. faecalis* of marine origin (positive gelatinase) with similar clinical group mortality. It was determined that marine enterococci, mainly *E. faecalis*, retain some virulence characteristics and antimicrobial resistance so its persistence in the marine environment is a threat to public health.

Keywords: Virulence, enterococci, multiresistance, pathogenicity, *G. mellonella*

1. INTRODUCCIÓN

Por varias décadas las especies de *Enterococcus*, debido a su característica de comensal intestinal, se creían inofensivas para los seres humanos y de poca importancia médica; incluso llegaron a utilizarse extensivamente como cultivos iniciadores o “*starter*” en la industria de los alimentos y los probióticos. Sin embargo, en la actualidad son reconocidos como uno de los más comunes y peligrosos agentes patógenos intrahospitalarios, que en algunos casos alcanzan una mortalidad en pacientes cercana al 61% (Silva *et al.*, 2005).

A nivel mundial las infecciones enterocócicas se encuentran entre las 10 primeras infecciones nosocomiales. Desde finales de la década de los años 80 emergieron peligrosamente como microorganismos muy versátiles con una rápida evolución en su virulencia relacionada con el empleo indiscriminado de antimicrobianos de amplio espectro, el uso de técnicas diagnósticas y terapéuticas invasivas, estancias hospitalarias prolongadas, aumento de la población inmunodeprimida, habilidad para adquirir determinantes genéticos de resistencia y la adquisición de nuevos factores de virulencia (Quiñones, 2010).

Las patologías desarrolladas por enterococos involucran comúnmente: bacteriemias, septicemias, sepsis hepatobiliar, infecciones piogénicas, intraabdominales, oculares, pélvicas e infecciones neonatales y endocarditis. Es el segundo microorganismo más comúnmente aislado de infecciones urinarias, además de ser el responsable del incremento de la estancia hospitalaria y generar un serio problema en la unidad de cuidados intensivos (UCI) de hospitales de todo el mundo.

Tan solo en Estados Unidos cada año se registran aproximadamente 800 000 casos de infecciones enterocócicas con un costo promedio de 500 millones de dólares

(Tendolkar *et al.*, 2003). El 2005 en el Reino Unido, se reportaron 7 066 casos de bacteriemias representando un incremento del 8% frente al registrado en el 2004, del cual el 28% presentaban casos de resistencia antimicrobiana; esto llevó a que la Agencia de Protección de la Salud (HPA) expresara que “un incremento tan considerable en las bacteriemias causadas por un solo tipo de patógeno jamás se había observado anteriormente” (*Health Protection Agency*, 2007).

Incluso a nivel local representan un serio problema de salud pública. Tan solo en el periodo de enero 2009 - enero 2010 en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen se reportaron 674 casos de infecciones severas por enterococos; según el género el 80.3% se diagnosticaron en infecciones urinarias en pacientes mujeres, mientras que el 11.5% de los casos se diagnosticaron en sangre; un patrón similar fue observado en pacientes varones, donde el 69.6% de los casos eran aislados de infecciones urinarias; mientras que el 16.7% de infecciones provenían de muestras de sangre (H.G.A.I., 2011).

La versatilidad genética enterocócica impulsada por una constante presión en el uso de antimicrobianos ha llevado a una rápida evolución en los patrones de virulencia; elementos móviles como transposones, plásmidos conjugativos, islas de patogenicidad y feromonas sexuales favorecen la adquisición e intercambio génico de virulencia, entre los cuales se enumeran: la gelatinasa enterocócica, responsable de la degradación indirecta del tejido conectivo, alteración del sistema inmune y promotor de la formación de biopelículas; la hialuronidasa enterocócica, que actúa sobre el ácido hialurónico facilitando la diseminación y ocasionando daño tisular; la hemolisina, una toxina con actividad hemolítica muy asociada con mortandad en bacteriemias nosocomiales; y la proteína de superficie enterocócica (ESP) que contribuye a la colonización del tracto urinario, formación de biopelículas y evasión del sistema inmune.

Los enterococos se liberan al ambiente por medio de las aguas residuales que provienen de zonas urbanas y rurales, hospitales e industria. Las características intrínsecas de resistencia a factores ambientales los hacen persistentes, incluso al tratamiento de las plantas depuradoras de aguas residuales. *Enterococcus* sobrevive por largos periodos aún en estas condiciones, planteándose la posibilidad de ser asimiladas por la cadena alimenticia y por contaminación con fuentes de agua para uso recreativo o consumo humano directo. Según la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) durante cada temporada de verano acuden mensualmente más de 1.3 millones de bañistas a las playas del litoral, y cada año se reportan nuevos casos de infecciones en ojos, oídos, piel y cuadros de gastroenteritis por exposición a aguas recreacionales contaminadas (Turbow *et al.*, 2003).

Dada la asociación de los enterococos en patologías nosocomiales y su persistencia en el mar se hace necesario realizar una mayor investigación focalizada en las características fenotípicas y moleculares de virulencia en cepas marinas y establecer su relación con las cepas de origen nosocomial, a fin de determinar si su persistencia constituye un potencial riesgo para la salud pública. En este estudio se evaluaron comparativamente 2 colecciones de cepas seleccionadas: el primer grupo procedente de estudios previos realizados por Guerrero & Alvarado (2005) en enterococos de origen marino donde se determinaron especies asociadas a patologías humanas; y una selección de cepas clínicas causantes de infecciones y aisladas de 12 Unidades de Servicio del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen para fines de esta investigación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. El Género *Enterococcus*: Taxonomía y Fisiología

El género *Enterococcus* pertenece al Phylum *Firmicutes* (Bacterias Gram positivas), el orden *Lactobacillales* y la familia *Enterococcaceae*. Tienen un genoma con un contenido en G+C < 50%, con una extensión de 3.2 mega bases (Mb) nitrogenadas en *Enterococcus faecalis* y 2.9 Mb para *Enterococcus faecium*. Morfológicamente, gracias a la tinción Gram, se observan cocos Gram positivos dispuestos en cortas cadenas, cocos simples o en pares; son además anaerobios facultativos, en su mayoría homo-fermentativos y no forman esporas. Los enterococos también están agrupados dentro de las bacterias ácido lácticas (BAL) y su uso en la industria probiótica se ha extendido durante la última década por ser productoras de péptidos antimicrobianos denominados bacteriocinas que presentan actividad contra un amplio rango de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* (Campos *et al.*, 2006).

Inicialmente los enterococos fueron incluidos en el grupo de los estreptococos. En 1930, Sherman clasificó a los estreptococos en cuatro clases: *Pyogenes*, *Lactis*, *Viridans* y *Enterococcus*, denominados también estreptococos fecales del Grupo D por presentar el antígeno del grupo D de Lancefield (Sood *et al.*, 2008). Schleifer y Kilpper (1984) basados en estudios de hibridación del ADN-ADN y ADN-ARNr demostraron diferencias significativas entre los estreptococos fecales del grupo D y los demás miembros del género *Streptococcus*, creándose así el género *Enterococcus*; esta separación fue confirmada luego por el análisis de secuencia del ARNr 16S y agrupados en diversos grupos *intra-especies* con características fenotípicas propias (Ludwig *et al.*, 1985). Así por ejemplo *E. faecalis* constituye un grupo diferenciado de las demás especies principales que están organizados dentro de los grupos *faecium*,

cecorum, *gallinarum* y *avium* (Tabla 1). El género *Enterococcus* agrupa hasta la fecha 40 especies en total (Devriese *et al.*, 1993; Panesso, 2010).

Fisiológicamente los enterococos son muy versátiles y, dependiendo de la especie, existen una variedad de sustratos que pueden servir como fuentes de energía, entre ellos: glicerol, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, α -cetoácidos y diaminoácidos (arginina y agmatina). Como todas las BAL, la fosforilación a nivel de sustrato es el mecanismo primario para la generación de ATP (Leblanc, 2006).

El género *Enterococcus* presenta diversos mecanismos que le permiten mantener la homeostasis y el control de las concentraciones de iones, lo cual explica su resistencia a la variación del pH, concentración de sales, metales y la desecación (Fisher y Phillips, 2009). Así por ejemplo, *E. faecalis* y *E. faecium* pueden crecer en un amplio rango de pH que va desde 4.6 a 9.9, con un pH óptimo de 7.5 (Van den Berghe *et al.*, 2006), esta capacidad está asociada con la estructura de la membrana celular, además de la participación de ATPasas asociadas a la membrana, que le confieren impermeabilidad y resistencia intrínseca a los ácidos y álcalis (Nakajo *et al.*, 2005).

Los enterococos crecen en un amplio rango de temperaturas que varían desde los 5 °C hasta los 50 °C, con una velocidad óptima de crecimiento a 35 °C. Algunos *E. faecalis* y *E. faecium* pueden sobrevivir aún hasta los 60°C por 30 minutos, distinguiéndose así del género *Streptococcus* (Foulque Moreno *et al.*, 2006). Su termo-resistencia al parecer esta relacionada con el contenido de ácidos grasos y lípidos de la membrana, la cual es más estable a bajas temperaturas. A altas temperaturas los enterococos van perdiendo resistencia, por lo que el contenido de ácidos grasos en la membrana se incrementa y sus niveles de saturación disminuyen. Su resistencia a altas temperaturas también suele ser dependiente de la fase de

crecimiento, así por ejemplo durante la fase estacionaria los enterococos son mucho más resistentes que en otras fases del crecimiento (Martínez *et al.*, 2003).

Otras características fisiológicas importantes están relacionadas con su tolerancia y desarrollo aún en presencia de sales biliares (40% w/v) y hasta un máximo de 6.5% de NaCl (w/v). Si bien los enterococos no contienen citocromo oxidasa (presentando una reacción catalasa negativa frente al peróxido de hidrógeno), muy ocasionalmente pueden producir una pseudo-catalasa, generando una efervescencia leve que podría considerarse erróneamente como positiva (Schleifer y Kilpper, 1984; Facklam *et al.*, 1985).

Tabla 1. Agrupación de las principales especies de *Enterococcus*

GRUPOS	ESPECIES
Grupo <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Grupo <i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<i>E. durans</i>
	<i>E. hirae</i>
	<i>E. mundtii</i>
Grupo <i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>
	<i>E. malodoratus</i>
	<i>E. raffinosus</i>
	<i>E. pseudoavium</i>
Grupo <i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i>
	<i>E. casseliflavus</i>
Grupo <i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i>
	<i>E. columbae</i>

Criterio de agrupación por caracterización
fenotípica según Williams *et al.* (1991)

2.2. El género *Enterococcus*: Aspectos ecológicos

Los enterococos son parte esencial de la microflora de humanos y animales de sangre caliente, comparten una distribución y diversidad muy similar en estas fuentes, siendo las especies de *E. faecium* y *E. faecalis* las más comunes en el tracto gastrointestinal (TGI). Diversos estudios han determinado mediante análisis del ARNr 16S y las técnicas convencionales de cultivo que estos microorganismos se localizan esencialmente en el intestino delgado, con una mayor abundancia en el yeyuno y el íleon (Hayashi *et al.*, 2005). El número de *E. faecalis* en heces humanas se encuentra en un rango de 10^5 a 10^7 UFC/gramo, y en el caso de *E. faecium* de 10^4 a 10^5 UFC/gramo (Fisher y Phillips, 2009). Adicionalmente, los enterococos se observan en menor cantidad en secreciones oro-faríngeas, vaginales, en la piel y en región perianal (Kayser, 2005).

El papel que los enterococos desempeñan en el TGI del hospedero no se ha establecido claramente. Ciertos estudios sugieren un papel modulador del sistema inmune en cerdos por *E. faecium* (Scharek *et al.*, 2005). En otros, la administración de *E. faecium* disminuye el recuento de *E. coli* recuperado de las heces de animales, a su vez que contribuye a disminuir la tasa de infección por *Chlamydia* en el intestino y en la vagina. Estas investigaciones muestran información preliminar, pues aún no se ha determinado por completo cómo la población endógena enterocócica podría contribuir a la protección del TGI de las infecciones por microorganismos patógenos (Panesso, 2010).

E. faecalis y *E. faecium* también son aislados frecuentemente en quesos, pescados, embutidos y carne molida. Muchos de estos alimentos, al ser de origen animal, están asociados por contaminación cruzada con enterococos que sobreviven a los procesos térmicos (Foulquie Moreno *et al.*, 2006). Algunas especies (como *E.*

mundtii y *E. casseliflavus*) incluso se relacionan con la microflora de plantas; de este modo, en climas templados son aislados frecuentemente de arbustos y flores durante la estación primaveral, mientras que la misma población disminuye drásticamente durante el invierno. Se ha especulado que los insectos juegan un rol importante en la distribución de los enterococos y la variación de su abundancia estacional (Devriese *et al.*, 2006).

Por otro lado, la evaluación microbiológica de las aguas superficiales y residuales usualmente involucra la detección de patógenos específicos y, más comúnmente, la detección de indicadores fecales. Los enterococos están bien correlacionados con la incidencia de enfermedades diarreicas observadas entre bañistas (Fujioka, 1997); Por ello y dada su persistencia en ambientes acuáticos, son considerados buenos indicadores de contaminación fecal.

2.2.1. Enterococcus en ambientes marinos y aguas residuales

El hábitat natural de las bacterias entéricas se encuentra en el intestino, por ende su presencia en otras fuentes naturales es señal de contaminación fecal. Cuando las aguas residuales se descargan en un sistema acuático natural, estos microorganismos alóctonos necesitan adaptarse para sobrevivir a un ambiente hostil y nuevo.

El ambiente marino se caracteriza por su naturaleza oligotrófica, donde la poca disponibilidad de nutrientes y otros factores abióticos tales como salinidad, radiación solar, temperatura y bajas concentraciones de oxígeno disponible ejercen una presión negativa sobre su supervivencia (Noble *et al.*, 2004). Estas condiciones adversas inducen fuertemente en la célula bacteriana diversos mecanismos de resistencia que

conlleven a un rápido cambio en el patrón de la expresión génica y una reorganización metabólica (Hartke *et al.*, 1998).

Las estrategias de supervivencia en microorganismos alóctonos involucran distintas respuestas como la adherencia a superficies tanto bióticas como abióticas y entradas al estado de “bacteria viable no cultivable” (BVNC), el cual es definido como un estado de silenciamiento de muchas actividades metabólicas; en estas condiciones son incapaces de crecer y formar colonias en medios de cultivo, pero las células mantienen la viabilidad, una producción específica de ARNm y modificaciones en la pared celular (Heims *et al.*, 2002). Tanto en el estado viable como en el viable-no cultivable se mantiene la capacidad de los enterococos para adherirse a superficies que contienen quitina, como la presente en el exoesqueleto de organismos zooplanctónicos, de esta manera su viabilidad se mantiene por un periodo mayor. Estas formas de resistencia no son detectadas por los métodos convencionales, así que la persistencia real de los patógenos en el ambiente marino estaría siendo subestimada (Signoretto *et al.*, 2004).

Por otro lado, las aguas residuales de zonas urbanas, granjas y hospitales constituyen un reservorio importante para los enterococos resistentes (ER) a antibióticos (algunos portadores de elementos genéticos de virulencia). El área costera de Lima y Callao concentra el vertimiento de aguas residuales domésticas e industriales de la ciudad, aportando al mar un caudal promedio de 10,91 m³/s (Salbatier *et al.*, 2008) y muchas veces sin tratamiento previo.

Los biosólidos, contenidos en estas aguas como materia fecal y otros desechos orgánicos, favorecen la persistencia de ER y otras bacterias, incluso cuando pasan por plantas de tratamiento de agua residual (PTAR). Blanch *et al* (2003) por ejemplo observaron una alta similitud en la composición de la estructura

poblacional enterocócica de aguas residuales de hospitales y otras zonas urbanas cercanas, determinando su influencia y aislando de estas fuentes cepas resistentes a eritromicina (ERE) y vancomicina (EVR).

Por otro lado Da silva *et al* (2006) demostraron que los procesos depurativos de las PTAR no reducen la carga enterocócica, mas aún contribuía a la selección de cepas resistentes, observando un incremento en la proporción de *E. faecium* frente a otros microorganismos. En Portugal se hallaron, en la fase final del proceso depurativo, enterococos resistentes a ciprofloxacina (33% de prevalencia), eritromicina (40%) y tetraciclina (57%).

Dado que las aguas residuales y otros efluentes (tratados o no) son arrojados indiscriminadamente a los cuerpos de agua dulce o marino-costeras, existe un dinámico y progresivo cambio en el ecosistema microbiano LO cual estaría impactando negativamente y constituyendo un potencial riesgo sanitario (Doud, 2011)

2.3. El Género *Enterococcus*: Aspectos genéticos

Los enterococos poseen una única y gran capacidad de intercambiar material genético entre sí y otros géneros, involucrando la transferencia de genes de virulencia, resistencia a metales pesados y antimicrobianos (Jett *et al*, 1994; Novais *et al*, 2005).

Los genomas de *E. faecalis* V583 y *E. faecium* ATCC BAA-472 han sido secuenciados por completo, encontrándose que más del 25% del genoma posee elementos móviles y/o elementos exógenos adquiridos que incluyen transposones conjugativos y compuestos, islas de patogenicidad, regiones de unión a fagos y plásmidos integrativos, y un alto número de secuencias de inserción.

Los plásmidos presentes en *Enterococcus* son los vehículos de transmisión para transposones y otros elementos genéticos que determinan resistencia y virulencia en la célula receptora, entre los más estudiados se encuentran los plásmidos pCF10, pAD1 y pPD1 (Folli *et al.*, 2008).

A diferencia de los sistemas de conjugación de bacterias Gram negativas, la conjugación en los enterococos no requiere la participación del pili, más bien envuelve un complejo sistema de conjugación inducida por feromonas. La bacteria contiene un plásmido conjugativo que responde a feromonas para el intercambio genético con un estrecho rango de receptor para la conjugación, incluyendo solo especies estrechamente relacionadas. La transferencia de plásmidos ocurre en respuesta a feromonas sexuales específicas, las cuales son péptidos secretados por la célula receptora libre del plásmido. La recepción de feromonas exógenas causa la expresión de proteínas involucradas en los procesos de conjugación (Clewell *et al.*, 2002).

Actualmente se reconoce que la virulencia en la mayoría de casos es multifactorial y coordinadamente regulada con genes de virulencia agrupados en distintas regiones denominadas islas de patogenicidad (PAI), que es un importante elemento en la evolución de patógenos y un mecanismo eficaz de transferencia horizontal de genes relacionados con virulencia. La primera PAI enterocócica se identificó en el genoma de la cepa multiresistente de *E. faecalis* MMH594, con un tamaño de 150 kb y que codifica 129 *ORF* (Shankar *et al.*, 1999). Entre los elementos de virulencia codificados se encontraron: la sustancia de agregación (*asa*), la proteína de superficie enterocócica (*esp*), la toxina hemolítica citolisina (*Operon Cyl*) y otros 18 *ORF* cuya función es desconocida.

2.4. Enterococcus y patología asociada

2.4.1. Endocarditis

Enterococcus es el tercer patógeno relacionado con mayor frecuencia en casos de endocarditis. Generalmente producen endocarditis del lado izquierdo del músculo cardíaco, donde la válvula mitral es más afectada que la aórtica (Rice *et al.*, 1991). La infección se puede generar tanto en las válvulas nativas como en las prostéticas con una prevalencia del 5% al 20% (Dargere *et al.*, 2002). Los pacientes afectados son predominantemente hombres con un promedio de edad entre 50 y 60 años. En las mujeres la endocarditis enterocócica se presenta durante la edad fértil, incluso durante el embarazo; estas infecciones se originarían al parecer en el tracto genitourinario (TGU) y el TGI (Malani *et al.*, 2002). Si bien *E. faecalis* es la especie más comúnmente aislada, también se han reportado casos de endocarditis infecciosa por *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. raffinosus* (Stepanovic *et al.*, 2004).

2.4.2. Infección del tracto urinario (ITU)

Las infecciones enterocócica del tracto urinario tienen una baja mortalidad y morbilidad, sin embargo incrementan considerablemente la estadía y los costos de hospitalización. Las ITU complicadas y no tratadas adecuadamente generan pielonefritis y abscesos perinefríticos desencadenado a su vez bacteriemias más severas (Upadhyaya *et al.*, 2009).

Los pacientes (principalmente hombres adultos) que han tenido cateterización urinaria o algún tipo de instrumentación, enfermedades del tracto urinario, o recibieron deficiente tratamiento con antibióticos son los principalmente afectados, siendo estas condiciones responsables que del 16% de pacientes con estas características

terminen con infecciones; en las mujeres jóvenes puede causar menos del 5% de ITU (Seno *et al.*, 2005).

2.4.3. Bacteriemias

El incremento de bacteriemias se presenta en pacientes hospitalizados por períodos muy prolongados. Actualmente los enterococos son terceros como agentes causantes de bacteriemias nosocomiales en Estados Unidos, por su parte las cepas EVR han producido 25 % de las infecciones en las unidades de cuidado intensivo (UCI).

Las bacteriemias provienen principalmente de infecciones del tracto urinario (responsable del 19% al 43% de los casos) y del TGI, pero también se asocian con cateterización uretral, dispositivos intravasculares, cirugías recientes, quemaduras, y terapia antimicrobiana previa, mientras que las infecciones de tejidos blandos pueden ser la fuente entre el 15 y 30% de las bacteriemias (NNIS, 1999). Los pacientes con un riesgo particular de bacteriemia causada por ERV son aquellos que están recibiendo hemodiálisis y los receptores de cortico-esteroides, de agentes anti-neoplásicos o de nutrición parenteral. Por otra parte, las bacteriemias secundarias ocurren principalmente en procedimientos ginecológicos e infecciones de heridas quirúrgicas (Panesso, 2010). Normalmente la bacteriemia enterocócica es indolente, caracterizada por fiebre. La mortalidad asociada con la bacteriemia se ha estimado entre el 7% y el 37% (Ghanem *et al.*, 2007).

2.4.4. Infecciones intraabdominales y pélvicas

Los enterococos son raramente aislados de las infecciones postquirúrgicas derivadas de un trauma abdominal penetrante, pero cuando están presentes se encuentran asociadas a otros microorganismos Gram negativos y anaerobios. Su rol en estas infecciones es aún muy controvertido, pero a pesar de este amplio debate se ha demostrado que pueden contribuir en la producción de abscesos y sepsis, y cuando se produce una bacteriemia enterocócica desde un foco intraabdominal la mortalidad es alta, con tasas por encima del 40%. Además se ha reportado que los enterococos son capaces de producir peritonitis espontánea y empieza en pacientes cirróticos o que presenten falla renal. Cuando las infecciones intraabdominales son ocasionadas por cepas EVR en los pacientes sometidos a trasplante desencadena un serio problema de salud (Panesso, 2010).

2.4.5. Otras infecciones enterocócicas

Raramente se reportan a los enterococos como únicos causantes de infecciones en la piel y tejidos blandos. Sin embargo se observan frecuentemente en infecciones mixtas de heridas postquirúrgicas, úlceras de pie diabético, y quemaduras. Son responsables del 12% de las infecciones del sitio quirúrgico; en infecciones de piel y tejidos blandos han sido identificadas como la fuente del 15% al 30% de las bacteriemias enterocócicas (Till *et al.*, 2002).

Se observan con mayor frecuencia asociadas a infecciones pediátricas, bacteriemias neonatales y sepsis. Los enterococos son responsables de aproximadamente el 13% de los casos de sepsis neonatal y raramente se reportan casos de meningitis. Otras infecciones no frecuentes incluyen las endoftalmitis endógenas o la otitis media con efusión. Los enterococos están raramente implicados en las infecciones del tracto respiratorio inferior.

2.5. **Enterococcus y su resistencia a la terapia antibiótica**

Los enterococos tienen una notable habilidad para sobrevivir en ambientes donde la presión selectiva es ejercida fuertemente por antibióticos. Esta resistencia en enterococos suele ser de dos tipos: resistencia inherente/intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia intrínseca es característica de cada especie y está presente en todos sus miembros, además de ser mediada cromosomalmente. *Enterococcus* exhibe resistencia intrínseca a penicilinas (susceptibles a penicilasas), cefalosporinas, lincosamida, ácido nalidíxico, bajos niveles de aminoglicósidos y clindamicina (Murray, 1990). De otro lado, la resistencia adquirida suele ser el resultado de mutaciones en el ADN o por la adquisición de ADN exógeno. Ejemplos de resistencia adquirida incluye resistencia a penicilinas por beta-lactamasas, altos niveles de resistencia a vancomicina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, aminoglicósidos, tetraciclina y resistencia a fluroquinolonas (Marothi *et al.*, 2005).

Los primeros reportes de resistencia a glicopéptidos aparecieron en 1980 con la presencia de aislados clínicos de *Enterococcus faecium* EVR, desde entonces se han extendido muy rápidamente. Estos eventos de resistencia en el ambiente se deben principalmente al incremento del uso de vancomicina en la práctica clínica humana misma y al uso del glicopéptido avoparcina empleado como aditivo en alimento balanceado para animales.

La resistencia de *Enterococcus* ha pasado de ser endémica a llegar a proporciones epidémicas en Norteamérica, similar situación observada en Europa, con un incremento en la mortalidad del 27% al 52% en pacientes infectados con cepas EVR. Para el 2005, la SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) reportó que de todos los aislados por infecciones en

sangre, el 2% de *E. faecalis* y el 60% de *E. faecium* eran resistentes a vancomicina (Bearman y Wenzel, 2005).

2.6. Determinantes de Virulencia en *Enterococcus*

Muchas especies de *Enterococcus* son altamente virulentas cuando provienen de aislados clínicos y animales de granja, seguidos de los aislados en alimentos (Ben-Omar *et al.*, 2004). Muchos factores determinan la virulencia facilitando así: la habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal, adherirse a una amplia variedad de proteínas de la matriz extracelular, al epitelio del tracto urinario, epitelio de la cavidad oral y células del riñón de embriones humanos (Fisher y Philips, 2009). Muchas infecciones también pueden ocurrir de forma endógena, por translocación de la bacteria a través de las células epiteliales del intestino, como consecuencia causan la infección de los nódulos de las vías linfales, y luego pueden trasladarse a otras células del cuerpo. Muchos determinantes de virulencia están involucrados en estos mecanismos de patogenicidad.

2.6.1. Proteína de superficie enterocócica (ESP)

La proteína ESP, asociada a la pared celular enterocócica, ha sido descrita como un factor que contribuye a la colonización y persistencia de infecciones en el tracto urinario, además promueve la adhesión y evasión del sistema inmune, formación de biopelículas y también estaría implicado en la resistencia a antibióticos (Fisher y Phillips, 2009).

ESP fue inicialmente identificada en aislados clínicos de *E. faecalis* (cepa MMH594) altamente virulentas y resistentes a gentamicina (Shankar *et al.*, 1999). Está vinculada a un elemento genómico con características de isla de patogenicidad (PAI) con un tamaño de 153 kb y que posee virtualmente todos los marcadores de un

PAI, incluyendo un menor porcentaje de G+C (32.2%) comparado con el porcentaje de G+C cromosomal (37.5%), posee además reguladores transcripcionales, transposasas y otras proteínas accesorias con roles de virulencia, adaptación y supervivencia en diferentes ambientes (Tendolkar *et al.*, 2003).

El gen *esp* tiene un tamaño de 5622 pb, mientras que la proteína ESP madura está constituida por 1873 aminoácidos. Esta proteína posee características estructurales distintivas que incluyen bloques largos y altamente conservados. Esta proteína tiene en su extremo N-terminal un péptido señal, un dominio putativo que podría estar implicado en la formación de biopelículas y en el extremo C-terminal un dominio de anclaje al peptidoglucano (con un motivo Y/F PXTG) el cual es reconocido por las sortasas, las cuales permiten anclar covalentemente la proteína ESP a la pared celular (Panesso, 2010).

Una variante de ESP (denominado ESP_{fm}) se ha descrito en un brote hospitalario de *E. faecium* resistente a vancomicina, y estaría asociada a una isla de patogenicidad diferente a la de *E. faecalis* MMH594 (Willems *et al.*, 2001). ESP_{fm} está presente en mayor proporción en aislados clínicos de *E. faecium* pertenecientes al genogrupo denominado CC17 (*Clonal Cluster 17*). El gen *esp_{fm}* está constituido por 5718 pb y codifica 1975 aminoácidos, presentando un 90% de identidad con respecto a la ESP de *E. faecalis*.

ESP y ESP_{fm} muestran una similaridad global y estructural a la proteína Bap de *Staphylococcus aureus* (asociada a la formación de biopelículas) y también a las proteínas Rib y alphaC, del grupo B de estreptococos, estas proteínas al parecer contribuirían a evadir la respuesta del sistema inmune (Born, 2005). La expresión de la proteína ESP y ESP_{fm} ha sido correlacionada con la adherencia inicial al poliestireno y la formación de biopelículas (Sava *et al.*, 2010).

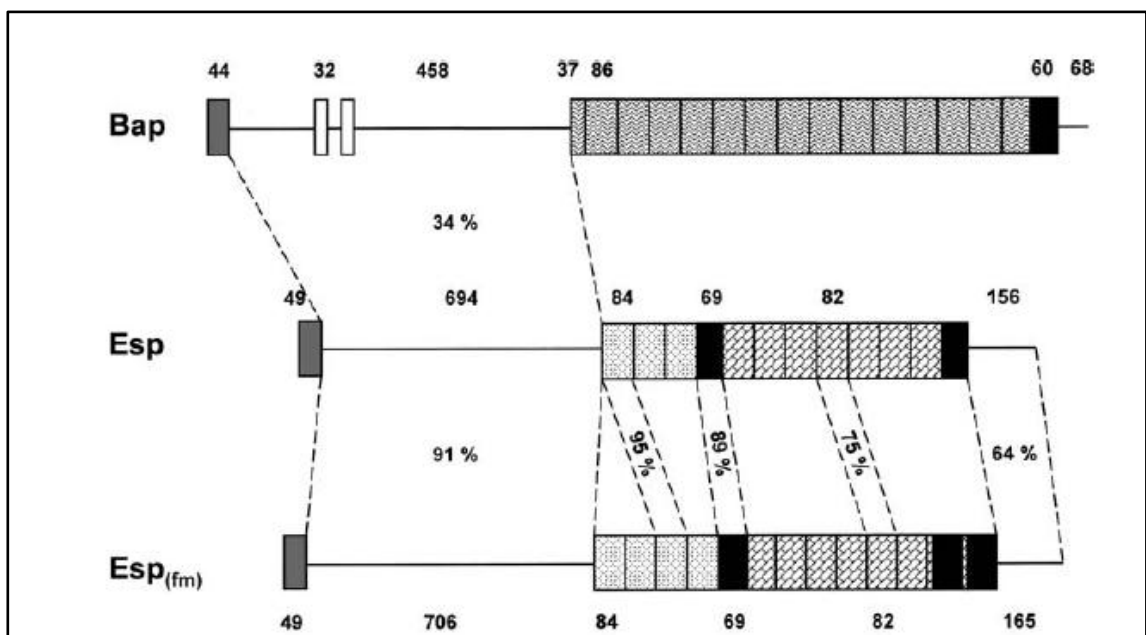


Figura 1. Representación esquemática de las similitud entre las proteína de superficie enterocócica de *E. faecalis* (ESP), *E faecium* (ESP_{Efm}) y la proteína Bap de *S. aureus* asociada con la formación de biopelículas. Las regiones que presentan identidad se muestran conectadas con líneas discontinuas y detallan los valores de los porcentajes de identidad (Tendolkar *et al.*, 2003).

2.6.2. Hemolisina

La hemolisina (también llamada citolisina), es una toxina identificada en el 60% de los aislados clínicos de *E. faecalis* (Panesso, 2010). Genéticamente asociada con elementos móviles como plásmidos y PAI's de *E. faecalis* y en menor grado como un operón individual dentro del cromosoma bacteriano (Ike y Clewell, 1992).

La citolisina tiene actividad tóxica contra células epiteliales del intestino, células retinales, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Los eritrocitos de bovinos, equinos, humanos y conejos son susceptibles a la hemólisis mediada por hemolisina, mientras que los eritrocitos de ovejas y cabras son resistentes a la actividad hemolítica. Esta susceptibilidad está relacionada con los mayores niveles de fosfatidilcolina presentes en las membranas celulares de animales susceptibles (Cox *et al.*, 2005).

La hemolisina exhibe similitud estructural y funcional con la estreptolisina S producida por *Streptococcus pyogenes*, una bacteriocina del tipo lantibiótica. La hemolisina enterocócica tiene un amplio espectro de actividad bactericida contra muchos organismos Gram positivos, que muy probablemente evolucionó a efecto del control local del nicho ecológico (Coburn y Gilmore, 2003).

La producción de hemolisina se relaciona con el incremento de la severidad de infecciones oculares y disminución de la actividad retinal, observado en modelos de endoftalmitis. En el caso de modelos de endocarditis, la inducción del daño tisular genera el incremento de la mortalidad en conejos (Mundy *et al.*, 2000; Murray y Weinstock, 1999). Por otro lado Ike *et al.*, (1984) demostraron que las cepas que expresan actividad hemolisina eran 10 veces más tóxicas que las cepas no hemolíticas

La expresión de la hemolisina requiere del producto de 8 genes agrupados en un Operón, dos de ellos denominados *cyiL_L* y *cyiL_S*, genes específicos de las subunidades peptídicas de la toxina citolítica; y los restantes 6 genes: *cyiR1*, *cyiR2*, *cyiM*, *cyiB*, *cyiA* y *cyiI* codifican proteínas involucradas en la modificación post-transcripcional de cada sub unidad, la secreción de los péptidos, la activación extracelular y además producir inmunidad frente a la propia toxina.

Inicialmente *CylL_L* y *CylL_S* tienen una extensión de 68 y 63 aminoácidos (aa) respectivamente, estos péptidos son modificados por sucesivamente por *CylM* y *CylB*. Finalmente *CylA* (una serina proteasa) genera la activación de las subunidades de la toxina. La hemolisina enterocócica madura está conformada por 2 subunidades: la subunidad grande *CylL_L* de 38 aa y la subunidad pequeña *CylL_S* de 21 aa (Coburn y Gilmore, 2003).

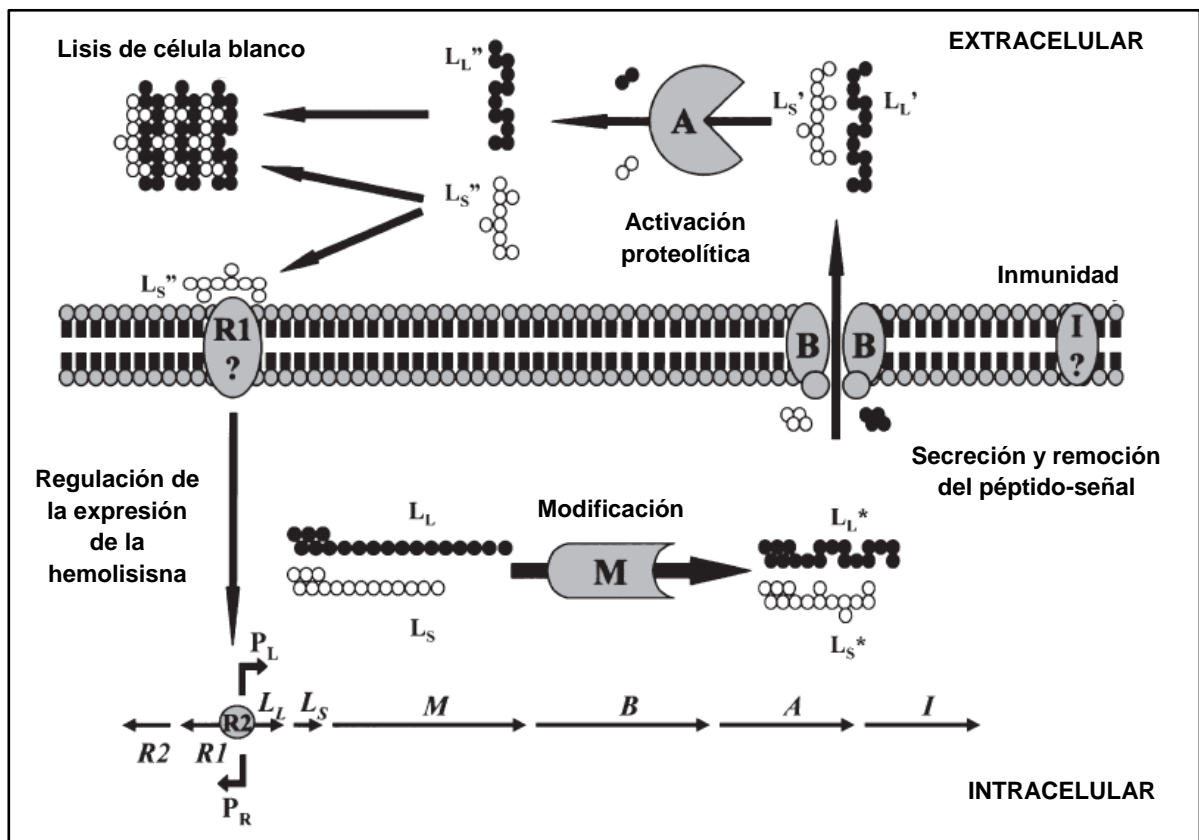


Figura 2. Modelo de la expresión de la hemolisina de *E. faecalis*. $CylL_L$ y $CylL_S$ son sintetizados como precursores de 68 y 63 aa (aminoácidos) respectivamente y modificados por el producto de *CylM*. Después de la modificación, las subunidades son secretadas y procesadas por *CylB*. Una secuencia de 6 aa idénticos es removida por el extremo N terminal de cada sub unidad por *CylA*, generando la activación de las subunidades de la toxina. Por otro lado *CylI* le confiere inmunidad propia a la célula bacteriana. La regulación de la expresión de todo el operón depende de los genes *cylR1* y *cylR2* (Coburn y Gilmore, 2003)

2.6.3. Gelatinasa enterocócica

La gelatinasa es una metaloendopeptidasa extracelular dependiente de zinc. Puede hidrolizar gelatina, colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina, insulina y otros péptidos bioactivos incluyendo feromonas sexuales de *E. faecalis* (Kayaoglu y Orstavik, 2004).

Junto con la transcripción de *gelE*, se cotranscribe una serina proteasa codificada por *sprE*, ésta se localiza directamente “río abajo” (*downstream*) de *gelE*. La expresión fenotípica de ambos genes requiere un sistema de regulación de 2 componentes codificado por un operón *fsrABCD*. El sistema *fsr* (*fecal streptococci regulator*) es homólogo al sistema de *quorum sensing agr* en *Staphylococcus aureus* y también ha sido implicado en la virulencia de *E. faecalis* independientemente de *gelE*.

El sistema *fsr* responde a la acumulación de péptido lactona que es codificada por *fsrD*. Se cree que este péptido es procesado y exportado hacia el espacio extracelular por el producto del gen *fsrB*. La acumulación del péptido es probablemente censada por FsrC, una Histidina-quinasa. Posteriormente FsrC lidera la activación del regulador de respuesta y la transcripción del factor FsrA mediante la adición de un grupo fosforil. La FsrA fosforilada activa la expresión de *gelE* y *sprE*, mientras que ciertos ensayos realizados en *chip* de microarreglos de ADN demostraron que el locus *fsr* activa la expresión de una amplia variedad de genes potencialmente involucrados en virulencia y otras vías metabólicas (Sava *et al.*, 2010).

Diferentes estudios del sistema *fsrABCD*, *sprE* y de la gelatinasa en la cepa *E. faecalis* OG1RF han señalado que estos genes son importantes en la producción de biopelículas así como también en virulencia en diferentes modelos animales. Por ejemplo mutantes de *fsr* y *gelE* han mostrado atenuación en el modelo de peritonitis de ratón, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, en el modelo de endoftalmitis en conejo, en modelos de endocarditis y más recientemente en la evasión del sistema inmune del insecto *Galleria mellonella* (Gaspar *et al.*, 2009).

Park *et al.*, (2007) determinaron que *gelE* degradaba el péptido antimicrobiano inducible cepropim Gm, que cumple un rol crítico en la defensa durante las primeras fases de la infección microbiana. GelE hidroliza la proteína del complemento C3a y es un intermedio en la degradación de la cadena alfa de C3b, un importante componente en la cascada de activación del sistema de complemento; de este modo inhiben la opsonización y la formación del complejo de ataque a la membrana.

2.6.4. Hialuronidasa enterocócica

El gen *hyl_{Efm}*, que posiblemente codifica una hialuronidasa enterocócica, ha sido postulada como un potencial factor de virulencia presente en aislados clínicos de *E. faecium*. La proteína *Hyl_{Efm}* tiene homología con otras hialuronidasas relacionadas con virulencia en otros patógenos Gram positivos, sin embargo la actividad hialuronidasa no ha sido detectada en cepas de enterococos que portan estos genes (Laverde *et al.*, 2011).

El gen *hyl* tiene una frecuencia genética mayor en cepas EVR que en cepas susceptibles a la vancomicina. Más aún *hyl_{efm}* no se detectó en 186 aislados fecales de *E. faecium* aislados de fuentes no hospitalarias (heces de voluntarios sanos, animales y cepas probióticas) mientras que en aislados clínicos fue identificado en el 34% de 264 aislados de *E. faecium* en los Estados Unidos. Estos genes están

presentes en aislados pertenecientes al genogrupo referido como *clonal cluster 17* (CC17), un grupo genéticamente relacionado y presente en la mayoría de infecciones enterocócicas ocasionadas por *E. faecium* en hospitales de todo el mundo (Arias *et al.*, 2009).

Se ha demostrado previamente que *hyl_{Efm}* es portado por megaplásmidos transferibles de diferentes tamaños (145 a 375 kb) en cepas hospitalarias con una amplia distribución en todo el mundo. Estos plásmidos también pueden albergar determinantes de resistencia a antibióticos y en algunos casos genes que codifican pilis. La adquisición de plásmidos *hyl_{Efm}* por la cepa *E. faecium* D344SRF incrementa la colonización del tracto gastrointestinal en ratones, lo cual es independiente de la presencia de marcadores de resistencia a antibióticos, a su vez la adquisición de *hyl_{Efm}* incrementa la virulencia de la cepa comensal *E. faecium* TX1330RF en modelos animales experimentales de peritonitis (Panesso *et al.*, 2011).

Tabla 2. Estrategias de patogenicidad relacionados a los factores de virulencia:

ESP, gelatinasa, hemolisina y hialuronidasa presentes en los enterococos

ESTRATEGIA/ VIRULENCIA	ESP	GELATINASA	HEMOLISINA	HIALURONIDASA
Adherencia a tejidos	Si	-	-	-
Invasión de tejidos	-	Si	Si	Si
Productos secretados	-	Si	Si	Si
Alteración del reconocimiento de la bacteria	Si	-	-	-
Bloqueo de la Opsonofagocitosis	Si	Si	Si	-
Intercambio genético	Si	Si	Si	Si

2.7. Modelos animales para evaluar la virulencia de *Enterococcus*

Los ensayos para cuantificar la virulencia de patógenos microbianos se han evaluado tradicionalmente en un amplio rango de mamíferos como modelos de experimentación; el uso de estos modelos provee mucha información de cómo funciona y responde el sistema inmune a las infecciones bacterianas. Comúnmente se han empleado para *Enterococcus* los modelos experimentales de peritonitis murina, de endocarditis en conejo o en rata, el modelo murino oro-gástrico y endoftalmitis en conejos; pero como complementación también se han realizado diferentes estudios *in vitro* empleando cultivos de enterocitos, macrófagos o células epiteliales con el fin de investigar la adherencia a los tejidos, invasión, translocación y sobrevivencia intracelular de los enterococos (Panesso, 2010).

Esta labor sin embargo, consume demasiado tiempo y es necesario poseer condiciones técnicas adecuadas. Por otro lado el mantenimiento y la disponibilidad de animales de experimentación, así como el manejo de muchas generaciones los hacen poco prácticos. Recientemente se ha demostrado que los insectos pueden ser usados para evaluar la patogenicidad y proveer resultados comparables a las que pueden ser obtenidos en mamíferos debido a que la respuesta de la inmunidad innata en los vertebrados es similar a la respuesta hallada en los insectos (Vilmos y Kurucz, 1998). Evolutivamente, la inmunidad innata en los vertebrados esta altamente conservada y su respuesta es considerada homóloga a la observada en insectos, con resultados comparables y válidos para el estudio de patógenos humanos.

La larva del gusano gigante de la miel de abeja, *Galleria mellonella* (Orden: *Lepidoptera*; Familia: *Pyralidae*) ha sido usado para evaluar las interacciones hospedero-patógeno y la mortalidad en un amplio rango de organismos que incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Proteus*

miriabilis, *Francisella tularensis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* y otros patógenos fúngicos (Peleg *et al.*, 2009).

El uso de *G. mellonella* presenta muchas ventajas, por ejemplo las larvas pueden mantenerse a 25 y 37°C, condiciones cercanas a las temperatura corporal de los mamíferos y adecuadas para el desarrollo de los patógenos, factor esencial para la síntesis de muchos determinantes de virulencia. Su manejo como modelos de experimentación también implican costos ínfimos, se emplean vías de inoculación más sencillas y son un modelo animal éticamente aceptable (Mukherjee *et al.*, 2010).

La inmunidad de *G. mellonella* es compleja, frente a una infección bacteriana se desencadenan eventos que involucran una respuesta inmune celular con la activación de diversos tipos de plasmocitos (prohaemocitos, plasmatocitos, granulocitos, coagulocitos, esferulocitos y oenocitos) y una respuesta humoral por la liberación de péptidos antimicrobianos, lisosoma, lectinas, una cascada de profenoloxidasas, serinproteasas y carbohidrasas, los cuales a su vez dirigen eventos de: coagulación de la hemolinfa, fagocitosis celular, melanización basada en fenoloxidasas, activación de la vía alternativa del complemento. La muerte de los patógenos es similar a la observada en los mamíferos por enzimas (por ejemplo lisozima), especies reactivas de oxígeno y péptidos antimicrobianos. *Galleria mellonella* emplea el reconocimiento de lo “no propio” al reconocer patrones moleculares asociados con patógenos por una línea germinal que codifican receptores (por ejemplo proteínas de reconocimiento a peptidoglucano), también se reconoce el daño ocasionado por patógenos observados por ejemplo en la detección de ácidos nucleicos liberados del daño celular o péptidos que resultan del clivaje proteolítico de proteínas propias por metaloproteinasas y dirige mecanismos de respuesta efectivas, similares a las respuestas observadas en mamíferos (Seitz *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Establecer las diferencias fenotípicas y moleculares de los determinantes de virulencia entre aislados de enterococos clínicos y marinos asociados a patologías humanas.

Objetivos Específicos:

- Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana, la actividad gelatinasa, actividad hemolítica y la formación de biopelículas *in vitro* entre los aislados marinos y clínicos.
- Identificar los genes de virulencia: *gelE*, *cylA*, *hyl* y *esp* en las cepas de estudio.
- Determinar la mortandad ocasionada por las cepas clínicas y marinas en el modelo animal experimental *Galleria mellonella*.

3.2. HIPÓTESIS

Hipótesis de la investigación:

Existen especies de enterococos marinos que estarían asociados a patologías humanas, los cuales conservan y expresan determinantes de virulencia presentes también en aislados de origen clínico, por lo que su persistencia en el ambiente marino constituye un riesgo potencial para la salud humana.

3.2.1. Variables de la investigación

Variables independientes:

- Dosis infectiva de las cepas en estudio.

Variables dependientes:

- Grado de mortalidad en *Galleria mellonella*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

Material biológico:

- Cepas de *Enterococcus* marinos (Tabla 3); colección de cepas constituida por 34 aislados ambientales de zonas marino-costeras de Lima (Pucusana, Miraflores y Ancón), pertenecientes a la colección del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la UNMSM y reportados previamente por Guerrero y Alvarado (2005).
- Cepas de *Enterococcus* clínicos; selección de 33 cepas de origen clínico pertenecientes a 12 Unidades de Servicio del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen, aislados durante el Periodo Julio 2010 a Julio 2011 y seleccionados para esta investigación (Tabla 4).
- Cepas de control para ensayos fenotípicos y moleculares: *Enterococcus faecalis* JH2-2, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* 283, *E. faecium* 14/18, *E. faecium* ATCC 35667, *E. faecium* 14/18, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. (Tabla 5).
- Larvas del lepidóptero *Galleria mellonella* para los ensayos de mortalidad adquiridas en el Programa Nacional de Control Biológico (PNCB-SENASA).

Material de Laboratorio:

- *DNA y Enzimas:* Secuencias de oligonucleótidos iniciadores para la amplificación de los determinantes de virulencia: *gelE*, *cylA*, *Hyl* y *esp* según Vankerckhoven *et al.* (2004), marcador molecular DNA Ladder 250 pb (Promega®), *Taq* polimerasa comercial.
- *Reactivos:* Agar TSA, agar Sangre, caldo BHI, agar Bilis Esculina, agarosa, solución amortiguadora TAE, bromuro de etidio, *buffer* fosfato, entre otros.
- *Materiales de vidrio y de plástico.* Frascos de 200 ml, tubos de 16x100, placas petri, matraces, probetas, asas se siembra, pipetas, placas de microtitulación de poliestireno.
- *Equipos:* micropipetas, microcentrífuga, termociclador, pHmetro, agitador rotatorio, microscopio, vórtex, transluminador, cámara de flujo laminar, lector de Elisa, equipo de electroforesis horizontal, entre otros.

Tabla 3. Cepas de enterococos marinos empleados en esta investigación. Colección del Laboratorio de la UNMSM

N°	CODIGO	ESPECIE	ANTIBIOTIPO
1	Efc17	<i>Enterococcus faecalis</i>	S/TE
2	Efc18	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
3	Efc26	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
4	Efc27	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
5	Efc42	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
6	Efc43	<i>Enterococcus faecalis</i>	EM
7	Efc92	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
8	Efm7	<i>Enterococcus faecium</i>	R/S
9	Efm13	<i>Enterococcus faecium</i>	R/EM/P
10	Efm14	<i>Enterococcus faecium</i>	R/EM/S
11	Efm65	<i>Enterococcus faecium</i>	-
12	Efm66	<i>Enterococcus faecium</i>	-
13	Efm70	<i>Enterococcus faecium</i>	-
14	Efm82	<i>Enterococcus faecium</i>	-
15	Efm89	<i>Enterococcus faecium</i>	S
16	Efm109	<i>Enterococcus faecium</i>	-
17	Ed2	<i>Enterococcus durans</i>	R
18	Ed4	<i>Enterococcus durans</i>	-
19	Ed5	<i>Enterococcus durans</i>	CIP
20	Ed10	<i>Enterococcus durans</i>	R/S
21	Ed12	<i>Enterococcus durans</i>	CIP/S
22	Ed30	<i>Enterococcus durans</i>	CIP/ R/S
23	Ed32	<i>Enterococcus durans</i>	S (VAN _{Int})
24	Ed33	<i>Enterococcus durans</i>	-
25	Ed90	<i>Enterococcus durans</i>	-
26	Eh8	<i>Enterococcus hirae</i>	-
27	Eh15	<i>Enterococcus hirae</i>	TE/NOR/CIP/P (VAN _{Int})
28	Eh20	<i>Enterococcus hirae</i>	NOR/R
29	Eh21	<i>Enterococcus hirae</i>	S
30	Eh22	<i>Enterococcus hirae</i>	S
31	Eh23	<i>Enterococcus hirae</i>	CIP/S (VAN _{Int})
32	Eh 29	<i>Enterococcus hirae</i>	S
33	Eh31	<i>Enterococcus hirae</i>	R/S
34	Eh 40	<i>Enterococcus hirae</i>	-

Tetraciclina (TE), norfloxacin (NOR), cloranfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), estreptomycin (S); vancomycin (VA).

Tabla 4. Cepas de enterococos clínicos empleados en esta investigación

Colección Hospital Guillermo Almenara Irigoyen

N°	CODIGO	ESPECIE	ORIGEN	UNIDAD	ANTIBIOTIPO
1	Efc22/21	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	Urología	TE/NOR/CIP
2	Efc09/17	<i>Enterococcus faecalis</i>	LCR	Neurocirugía	TE/R/EM
3	Efc06/05	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	Nefrología	CIP/R
4	Efc03/22	<i>Enterococcus faecalis</i>	Sangre	Gastroenterología	TE/C/CIP/EM/S
5	Efc05/23	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	UCI	TE/NOR/CIP/S
6	Efc13/20	<i>Enterococcus faecalis</i>	LP	UCI	TE/C/CIP/EM/S
7	Efc05/26	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	Urología	TE
8	Efc05/07	<i>Enterococcus faecalis</i>	Sangre	C-HVB	C/CIP/EM/S
9	Efc05/27	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	Urología	-
10	Efc188-11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	UCI	-
11	Efc08/24	<i>Enterococcus faecalis</i>	Orina	MI	TE/NOR/CIP/R/P/VAN
12	Efm30/15	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	MI	NOR/CIP/R/P/S
13	Efm22/04	<i>Enterococcus faecium</i>	LA	UTH	CIP/R/EM/P/S/VAN
14	Efm12/20	<i>Enterococcus faecium</i>	L	UCI	CIP/EM/P
15	Efm09/22	<i>Enterococcus faecium</i>	Sangre	UCI	CIP/EM/P
16	Efm28/09	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	UCI	NOR/CIP/P
17	Efm12/19	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	Endocrinología	-
18	Efm10/13	<i>Enterococcus faecium</i>	IAB	UCI	CIP/EM/P/S/VAN
19	Efm06/09	<i>Enterococcus faecium</i>	CEV	UCI	TE/CIP/EM/P/S/VAN
20	Efm27/08	<i>Enterococcus faecium</i>	CVC	UCI	CIP/R/EM/P/S/VAN
21	Efm18/18	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	Nefrología	TE/NOR/CIP/P/S/VAN
22	Efm07/13	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	Neonatología	NOR/CIP/P/S/VAN
23	Efm13/13	<i>Enterococcus faecium</i>	AHE	UTH	CIP/EM/P/S/VAN

Origen y unidad: AHE: Absceso hepático; CG: Cirugía general; CEV: Catéter endovenoso; CVC: Catéter venoso central; C-HVB: Cirugía Hígado-Vías biliares; HR: Hisopado rectal; IAB: Intraabdominal; LA: Líquido ascítico. LDP: Líquido de diálisis peritoneal; UCI: Unidad de cuidados intensivos; UTH: Unidad de trasplante de hígado. Tetraciclina (TE), norfloxacin (NOR), cloranfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), estreptomicina (S); vancomicina (VA).

Tabla 4. Cepas de enterococos clínicos empleados en esta investigación; continuación

N°	CODIGO	ESPECIE	ORIGEN	UNIDAD	ANTIBIOTIPO
24	Efm23/18	<i>Enterococcus faecium</i>	LDP	Nefrología	CIP/R/EM/P/S/VAN
25	Efm02/12	<i>Enterococcus faecium</i>	CVC	UCI	TE/CIP/EM/P/S/VAN
26	Efm09/23	<i>Enterococcus faecium</i>	LDP	Nefrología	TE/NOR/CIP/P/S/VAN
27	Efm21/03	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	Ginecología	TE/NOR/CIP/P/S/VAN
28	Efm19/13	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	CG	TE/NOR/CIP/R/P/S/VAN
29	Efm314-11	<i>Enterococcus faecium</i>	Orina	Urología	TE/NOR/CIP/R/P/S/VAN
30	Eh188-4A	<i>Enterococcus hirae</i>	HR	Hematología	NOR
31	Ed188-4B	<i>Enterococcus durans</i>	Orina	MI	CIP/S
32	Ent 189 - 11	<i>Enterococcus raffinosus</i>	HR	Hematología	-
33	Ent 757-10	<i>Enterococcus avium</i>	HR	Hematología	-

Origen y unidad: CG: Cirugía general; CVC: Catéter venoso central; HR: Hisopado rectal; LDP: Líquido de diálisis peritoneal; M.I.: Medicina interna; UCI: Unidad de cuidados intensivos. Tetraciclina (TE), norfloxacin (NOR), cloranfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), rifampicina (R), eritromicina (EM), penicilina (P), estreptomicina (S); vancomicina (VA).

Tabla 5. Cepas patrón y de referencia usadas en esta investigación

CEPA	GENES DE VIRULENCIA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS
<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2	<i>gelE</i> +	Bp+/BH-/GEL-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	n.i.	BH-/GEL-
<i>Enterococcus faecalis</i> Efc283	<i>esp</i> +/ <i>cytA</i> +/ <i>gelE</i> +	Bp++/BH+/GEL +
<i>Enterococcus faecium</i> Efm14/18	<i>hyl</i> +	Van _R /Bp-/BH-/GEL-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 35667	n.i.	Van _S /Bp-/BH-/GEL-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	Bp-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	Bp++

Vancomicina: resistente (Van_R); sensible (Van_S); biopelículas: fuerte (Bp++); moderado (Bp+); débil (Bp-); beta hemólisis: positiva (BH+); negativa (BH-); gelatinasa: positiva (GEL+); negativa (GEL-); ni: no indica

4.2. METODOS

4.2.1. Selección, identificación y reactivación de cepas

Se seleccionaron 34 aislados de la colección de *Enterococcus* marinos reportados por Guerrero y Alvarado (2005) y cuya asociación con patologías humanas fue previamente establecida por Sumi (2008). Por otro lado, se seleccionaron para este estudio 33 cepas de *Enterococcus* aislados en 12 unidades de Servicio del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

Se reactivaron todas las cepas en caldo infusión cerebro corazón (BHI) por 48 horas, posteriormente se sembraron en Agar Bilis esculina (ABE; OXOID) e incubados a 37 °C por 24 horas, verificándose el comportamiento cultural típico en agar ABE, la coloración Gram y la prueba de catalasa. La identificación de los enterococos de origen clínico se realizó mediante un análisis automatizado en MicroScan *WalkAway* en el mismo hospital y reportados en el informe de Microbiología de cada Unidad; mientras que los enterococos marinos se identificaron en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología (FCCBB-UNMSM) como lo describen previamente Guerrero y Alvarado (2005). Todas las cepas se conservaron en viales con agar semisólido TSA y crioviales conteniendo glicerina (50%).

4.2.2. Determinación de los antibiotipos de resistencia

Los perfiles de resistencia antimicrobiana se recopilaron de Sumi (2008) para el grupo de enterococos marinos y de las fichas de aislamiento de las cepas clínicas de MicroScan que utiliza la metodología de microdilución en caldo por puntos de corte del sistema automatizado *MicroScan WalkAway* (Siemens Medical Solutions *Diagnostics*) con paneles convencionales.

Los antibióticos evaluados fueron: tetraciclina, norfloxacin, cloranfenicol, ciprofloxacina, rifampicina, eritromicina, penicilina, estreptomycin y vancomicina. Se establecieron el número y la frecuencia de los antibiotipos.

4.2.3. Ensayos fenotípicos de virulencia

Se ensayaron pruebas fenotípicas para determinar la actividad gelatinasa, hemolisina y la formación de biopelículas; cuya actividad *in vitro* es frecuentemente vinculada con la expresión de los determinantes genéticos de virulencia: *gelE* *cylA* y *esp*.

4.2.3.1. Determinación de la actividad gelatinasa

Para la determinación de la actividad gelatinasa se desarrolló, con algunas modificaciones, la metodología empleada por Pires-Boucas *et al.* (2010):

Las cepas se inocularon en caldo BHI por 18 horas a 37°C, luego 2 mL se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos en microtubos *Eppendorf*, se lavaron los *pellets* con *Buffer* fosfato salino (PBS), se resuspendieron con 1.5 mL de PBS y se llevaron a una escala de 0.5 Mc Farland. Se inocularon 5 microlitros (ul) de cada suspensión bacteriana sobre discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro ubicados sobre agar nutritivo con 1% (w/v) de gelatina (OXOID) y las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.

Posteriormente las placas se revelaron con el reactivo de Frazier, adicionándose 5 ml sobre las placas petri. Luego de 5 minutos se tomaron las medidas de los halos de degradación determinándose los promedios y las desviaciones estándar. La actividad gelatinolítica relativa se definió como la relación entre el diámetro de degradación de la gelatina (R) y el diámetro del disco de Filtro (r). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

4.2.3.2. Determinación de la actividad hemolítica

La determinación de la actividad hemolítica se realizó según la metodología descrita por Arularasi *et al.* (2011).

Las cepas de *Enterococcus* se inocularon en caldo BHI por 18 horas a 37°C, posteriormente se sembraron por estriado sobre agar Tood Hewitt (DIFCO) suplementado con 5% de sangre humana desfibrinada. Las placas se incubaron a 37 °C en cámara saturada con dióxido de carbono por 48 horas. El ensayo cualitativo se evaluó como positiva por la presencia de halos claros de *beta* hemólisis considerandose positivos para la producción de hemolisina; mientras que una hemolisis parcial (*alpha* hemólisis) o una no hemólisis (*gamma* hemólisis) se consideraron resultados negativos. Adicionalmente las cepas positivas se resembraron en agar sangre de cordero bajo las mismas condiciones para confirmar la especificidad de la actividad hemolítica sobre sangre humana.

4.2.3.3. Determinación de la formación de biopelículas *in vitro*

La capacidad de los aislados para formar biopelículas *in vitro* se estudiaron utilizando una modificación de la metodología descrita por Mulla *et al.* (2011) y otros autores (Toledo-Arana *et al.*, 2001; Tendolkar *et al.*, 2004; Marra *et al.*, 2006).

a) Estandarización de la prueba y lectura de cepas de referencia

Se utilizaron cepas de control como: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (fuerte productor), *E. faecalis* JH2-2 (productor moderado) y *S. aureus* ATCC 25923 (débil productora de biopelícula).

Para optimizar la producción de biopelículas se utilizó glucosa en el medio de cultivo como inductor. Las cepas control se cultivaron en 3 medios: caldo Tripticasa de Soya (TSB) sin glucosa, TSB con 0.5% y 0.75% (w/v) de glucosa por 18 horas. Los

cultivos se diluyeron respectivamente (1/200) en nuevos medios y se dispensaron 150 ul de esta dilución sobre placas de micro titulación de poliestireno (BRAND).

Después de 24 horas de incubación a 37 °C de las placas, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS y se colocaron invertidos a secar en estufa a 56°C por 30 minutos. Luego se adicionó a cada pocillo 150 ul de Safranina al 0,1% (w/v) por 30 minutos, posteriormente se lavaron los pocillos 3 veces con agua destilada y se colocaron en la estufa a secar. El colorante unido a la biopelícula se extrajo con la adición de 150 ul de una solución de etanol y acetona (80:20 v/v). La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó a 492 nm con referencia a 630 nm en un Lector de Elisa ER500 (SINNOWA). Se realizaron 3 réplicas con 5 repeticiones por cepa control.

Para establecer los intervalos de clasificación de las biopelículas se realizaron lecturas sucesivas de los controles. Los pocillos de la placa conteniendo medio sin inocular, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923 fueron utilizados como controles para el *Cut off*, control positivo y control negativo respectivamente. El *Cut off* se definió como las 3 desviaciones estándar por encima de la media de la densidad óptica del medio sin inocular (DOc). Los aislados se clasificaron según su capacidad de producir biopelículas en poliestireno como: débil ($DO \leq 2DOc$), moderado ($2DOc < DO \leq 4DOc$) y Fuerte ($4DOc < DO$). Los ensayos se realizaron con 3 réplicas y 4 repeticiones.

b) Lectura de las cepas de estudio

Las cepas en estudio se cultivaron en caldo Tripticasa de Soya (TSB) con glucosa (0,75% w/v) por 18 horas. Los cultivos se diluyeron (1/200) en medios frescos y 150 ul se dispensaron sobre las placas de microtitulación de poliestireno (BRAND). Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se lavaron los pocillos 3 veces con PBS, se colocaron invertidos a secar en estufa a 56 °C por 30 minutos y se procedió a la tinción

con safranina como fue descrito anteriormente. La lectura de la densidad óptica (DO) se realizó en un Lector de Elisa ER500 (SINNOWA) a 492 nm con referencia a 630 nm. Se realizaron cinco lecturas por cada cepa.

4.2.4. Ensayos moleculares para determinar los genes de virulencia

4.2.4.1. Extracción del DNA total

Todas las cepas se inocularon en caldo BHI y se incubaron a 37 °C, cinco mililitros de cada cultivo “*overnight*” se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos y se lavaron los *pellets* 5 veces con PBS. Se resuspendió el sedimento con 1 ml de solución de resina Chelex100 (15% w/v). Cada microtubo conteniendo la mezcla bacteria/resina se sometió a un baño de agua hirviendo por 10 minutos. Inmediatamente después se llevaron a enfriar por 5 minutos en refrigeración y se volvieron a centrifugar (4000 rpm por 15 minutos). El sobrenadante se trasladó con una micropipeta a otro microtubo estéril conteniendo 500 ul de *buffer TE*. Se homogenizó la mezcla y se conservó a -20°C para realizar los ensayos posteriores (Kalteringer, 2007).

4.2.4.2. Estandarización del PCR múltiplex

Se utilizaron los iniciadores descritos por Vankerckhoven *et al.* (2004) para los marcadores de virulencia *gelE*, *cylA*, *hyl* y *esp* (Anexo 1). Previamente se verificó cada par de iniciadores realizando PCR individuales empleando las cepas de control. Se usaron por cada reacción 45ul del kit *Platinum PCR Supermix* (Invitrogen), 3ul de la extracción y 0.2 uM del iniciador. Las reacciones son amplificadas en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) de acuerdo al programa establecido por el producto. Posteriormente se realizaron los PCR multiplex de las cepas control mediante la preparación del *master mix* para la PCR multiplex (Anexo 2). Se utilizó 0.1uM como concentración final para los iniciadores *hyl* y *gelE*; mientras que en los iniciadores *esp*

y *cylA* se emplearon 0.2uM. La concentración final de $MgCl_2$ también se incrementó a 2mM, se utilizaron además 2 U de *Taq* polimerasa y 4ul de templado de ADN por cada reacción.

El programa de amplificación consistió en: 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 min), alineamiento o “*annealing*” (55°C por 1 min), y extensión (72°C por 1 min), finalmente un ciclo de 10 min at 72°C. Los productos de PCR, mezclados con *buffer* de carga, se corrieron en un gel de agarosa 1.8% (w/v) a 80V por 60 minutos en una cámara electroforética, se empleó además un marcador molecular de 250 pb (Promega). El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador UV (BIOMETRA TI1).

4.2.5. Ensayos de Mortalidad de *Galleria mellonella*

4.2.5.1. Estimación de la concentración del patógeno

Se determinaron las concentraciones necesarias para preparar las soluciones *stock* del patógeno, previo a la estimación de la dosis a inocular (UFC/larva). Se utilizaron 2 cepas de referencia para el recuento: *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* ATCC 35667, ambas se cultivaron en caldo BHI por 18 horas a 37°C, luego 5 mL de cada cultivo se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos, se lavaron 3 veces los *pellets* con *buffer* fosfato salino (PBS) estéril, luego se resuspendieron con 5 mL de PBS y se llevaron cada tubo por cepa a una escala de 0.5 Mc Farland en un turbidímetro. Se realizaron a partir de cada tubo recuentos en placa en agar Tood Hewitt por diseminación sembrándose las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} y paralelamente se leyeron las absorbancias de estos tubos a 625 nm; el ensayo se realizó por duplicado y con 3 repeticiones.

Se determinó el recuento (UFC/ml) y la absorbancia (equivalente a 0.5 Mc Farland) denominándose a esta la concentración *stock*, se realizaron soluciones *stock* para 2 controles: Control positivo (Cepa Efc283) y control negativo (Cepa Ed90). A partir del stock de cada control se prepararon convenientemente diluciones con solución salina estéril suplementado con ácido nalidíxico (20 ug/ml) en donde las cepas alcanzaron aproximadamente 4 concentraciones: 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 (UFC /ul).

4.2.5.2. Determinación de la dosis infectiva

Se inocularon diferentes dosis (10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/larva) de la cepa de control positivo (Efc283) en grupos de 20 de larvas y de la misma manera se procedió con el control negativo (Ed90). Un grupo distinto fue inoculado solo con solución salina estéril suplementado con ácido nalidíxico (20 ug/mL) para el control de inoculación. Se monitoreó la mortandad de las larvas por 72 horas, con estos datos se constuyeron las curvas de supervivencia de Kaplan–Meier con el programa *GraphPad Prism* (versión 6.0; *GraphPad Software*) para cada dosis inoculada en cada grupo.

Determinada la concentración de trabajo y seleccionada las cepas a evaluar, se desarrollaron los ensayos de mortalidad; 20 grupos de larvas (con un peso promedio de 250 a 350 mg), se refrigeraron (4 °C) por 20 minutos previos a la inoculación. Se desinfectó la superficie de la base de la pata posterior de cada larva con alcohol de 70° y se inocularon 10ul de la dosis del patógeno con un micro inyector unida a una jeringa con una aguja de 0.45x12 mm. Luego de inocular las larvas de cada grupo se incubaron controladamente en placas de plástico a 37 °C sin alimento y se monitoreó la mortandad cada 8 horas por 72 horas, las larvas se consideraron muertas cuando permanecieron inmóviles ante un estímulo mecánico (Seed y Dennis, 2008), con los datos se construyeron las curvas de supervivencia Kaplan-Meier para su análisis estadístico. Se consideró una baja mortandad cuando el porcentaje de supervivencia

fue mayor o igual al 75%, una alta mortandad cuando el porcentaje de supervivencia es inferior al 25% y una mortandad moderada cuando el porcentaje de supervivencia fue superior al 25% e inferior al 75% a las 72 horas post inoculación y se definió la mortandad media como el tiempo (horas) que transcurre hasta que el 50% de la población experimental a muerto.

4.2.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se desarrollaron con los programas informáticos IBM SPSS *statistics* (versión 21); *GraphPad Prism* (versión 6) y *Microsoft Excel* 2010. Para determinar si los datos presentaban una distribución normal se utilizaron las pruebas de normalidad mediante el método de *Kolmogorov-Smirnov* y *Shapiro-wilk* y el análisis de medias (análisis paramétrico) múltiples se realizó con Anova, mientras que los datos que no presentaron una distribución normal se analizaron mediante el método de *Kruskal-Wallis* (análisis no paramétrico de medianas).

La tasa de mortalidad de *G. mellonella* fue comparada usando la prueba de *t student* (*two-tailed unpaired*) con un intervalo de confianza del 95%. Las curvas de supervivencia se construyeron por el método de Kaplan–Meier y comparados por el análisis log-rank y Gehan-Breslow-Wilcoxon *test* (*GraphPad Prism*, versión 6.0; *GraphPad Software*). Los P-valores < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos (Gaspar *et al.*, 2009).

5. RESULTADOS

5.1. Selección de cepas y perfiles de resistencia antimicrobiana

Los antibiogramas de resistencia dentro del grupo de enterococos marinos (Tabla 6) se mostraron distintos para cada especie con 6 y 5 antibiogramas en *E. durans* y *E. hirae* respectivamente, con los perfiles: CIP/S, R/S y S comunes entre ambas especies. Mientras que *E. faecalis* presentó baja resistencia antimicrobiana con solo 2 perfiles de resistencia (TE/S y EM) y 5 cepas (71.4% de la especie) no presentaron resistencia a los antibióticos estudiados, de igual manera el 55.6% de *E. faecium* se mostraron sensibles. La resistencia a rifampicina (26.5%) y estreptomicina (38.2%) fueron los casos reportados con mayor frecuencia dentro del grupo de enterococos marinos (Tabla 7). No se registraron cepas resistentes a vancomicina y cloranfenicol.

Se observaron elevados niveles de resistencia en las cepas clínicas con distintos perfiles de resistencia antimicrobiana (Tabla 6) que involucraron hasta 7 antibióticos. La resistencia a ciprofloxacina (75.8% del total de cepas clínicas) fue la más común dentro de este grupo. Por el contrario se observaron diferencias dentro de cada especie de enterococo (Tabla 8), para *E. faecalis* la resistencia a la tetraciclina (63.6% del total de la especie), la eritromicina (36.4%) y la estreptomicina (36.4%) fueron las más comunes, mientras que en *E. faecium* la penicilina (94.4% del total de la especie), estreptomicina (77.8%), vancomicina (72.2%) y la eritromicina (50%) son los antibióticos a los cuales se observaron resistencia. En *E. faecium* se reportaron las cepas más resistentes con perfiles de resistencia desde 3 hasta 7 antibióticos en el 94.4% de la especie, tan solo una cepa fue sensible a todos los antibióticos evaluados.

Se observó además que los perfiles de resistencia son distintos dependiendo del tipo de infección y las especies involucradas (Tabla 9); para las muestras de orina

el perfil presente en el 75% de *E. faecium* ostentaba resistencia a 4 antibióticos (NOR/CIP/P/S) mientras que en *E. faecalis* se observó baja resistencia. Las infecciones en sangre presentaban el mayor porcentaje de resistencia a cloranfenicol (66.7%) que en las otras infecciones donde casi siempre eran sensibles. En las muestras aisladas de catéter y abscesos todas correspondieron a *E. faecium* y el 100% de ellas eran resistentes a 5 antibióticos (CIP/EM/P/S/VAN).

Adicionalmente se observó que la resistencia a vancomicina en *E. faecium* solo estaba presente en los perfiles con multiresistencia a 5 o más antibióticos al igual que en una cepa clínica de *E. faecalis* (Efc08/24) y única con multiresistencia (6 antibióticos). Otros enterococos como *E. durans* y *E. hirae*, presentaron resistencia a ciprofloxacina, estreptomicina (cepa Ed188-4B) y norfloxacina (cepa Eh188-4A), mientras que *E. raffinosus* y *E. avium* fueron sensibles a los antibióticos usados en esta investigación.

Tabla 6. Perfiles de resistencia antimicrobiana

ESPECIES	RESISTENCIA N° ANTIBIOTICOS	ANTIBIOTIPO CLINICO	n	%	ANTIBIOTIPO MARINO	n	%
<i>E. faecalis</i>	6	TE/NOR/CIP/R/P/VAN	1	9.1		0	0.0
	5	TE/C/CIP/EM/S	2	18.2		0	0.0
	4	TE/NOR/CIP/S	1	9.1		0	0.0
		C/CIP/EM/S	1	9.1		0	0.0
	3	TE/NOR/CIP	1	9.1		0	0.0
		TE/R/EM	1	9.1		0	0.0
	2	CIP/R	1	9.1	TE/S	1	14.3
	1	TE	1	9.1	EM	1	14.3
	0	-	2	18.2	-	5	71.4
<i>E. faecium</i>	7	TE/NOR/CIP/R/P/S/VAN	2	11.1		0	0.0
	6	CIP/R/EM/P/S/VAN	2	11.1		0	0.0
		TE/CIP/EM/P/S/VAN	2	11.1		0	0.0
		TE/NOR/CIP/P/S/VAN	3	16.7		0	0.0
		CIP/R/EM/P/S/VAN	1	5.6		0	0.0
	5	NOR/CIP/R/P/S	1	5.6		0	0.0
		NOR/CIP/P/S/VAN	1	5.6		0	0.0
		CIP/EM/P/S/VAN	2	11.1		0	0.0
	4		0	0.0		0	0.0
	3	CIP/EM/P	2	11.1	R/EM/P	1	11.1
		NOR/CIP/P	1	5.6	R/EM/S	1	11.1
	2		0	0.0	R/S	2	22.2
	1		0	0.0		0	0.0
	0	-	1	5.6	-	5	55.6
<i>E. durans</i>	3		0	0.0	CIP/R/S	1	11.1
	2		0	0.0	R/S	1	11.1
		CIP/S	1	100.0	CIP/S	1	11.1
	1		0	0.0	R	1	11.1
					CIP	1	11.1
					S	1	11.1
	0		0	0.0	-	3	33.3
<i>E. hirae</i>	4		0	0.0	TE/NOR/CIP/P	1	11.1
	3		0	0.0		0	0.0
	2		0	0.0	NOR/R	1	11.1
					CIP/S	1	11.1
					R/S	1	11.1
	1	NOR	1	100.0	S	3	33.3
	0	-	0	0.0	-	2	22.2
<i>E. raffinosus</i>	0	-	1	100.0			
<i>E. avium</i>	0	-	1	100.0			

Tetraciclina (TE); norfloxacin (NOR); cloranfenicol (C); ciprofloxacina (CIP) rifampicina (R); eritromicina (EM); penicilina (P); estreptomicina (S); vancomicina (VA). N: número de cepas que presentan el antibiotipo. %: porcentaje por especie.

Tabla 7. Resistencia antimicrobiana: enterococos marinos

	TE	NOR	C	CIP	R	EM	P	S	VA
<i>E. faecalis</i>	1 (14.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)
<i>E. faecium</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (44.4%)	2 (22.2%)	1 (11.1%)	3 (33.3%)	0 (0.0%)
<i>E. durans</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (44.4%)	0 (0.0%)
<i>E. hirae</i>	1 (11.1%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	2 (22.2%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)	5 (55.5%)	0 (0.0%)
Total (n=34)	2 (5.9%)	2 (5.9%)	0 (0.0%)	5 (14.7%)	9 (26.5%)	3 (8.8%)	2 (5.9%)	13 (38.2%)	0 (0.0%)

Tabla 8. Resistencia antimicrobiana: enterococos clínicos

	TE	NOR	C	CIP	R	EM	P	S	VA
<i>E. faecalis</i>	7 (63.6%)	3 (27.3%)	3 (27.3%)	7 (63.6%)	3 (27.3%)	4 (36.4%)	1 (9.1%)	4 (36.4%)	1 (9.1%)
<i>E. faecium</i>	7 (38.9%)	8 (44.4%)	0 (0.0%)	17 (94.4%)	6 (33.3%)	9 (50.0%)	17 (94.4%)	14 (77.8%)	13 (72.2%)
otros enterococos	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	0 (0.0%)
Total (n=33)	14 (42.4%)	12 (36.4%)	3 (9.1%)	25 (75.8%)	9 (27.3%)	13 (39.4%)	18 (54.5%)	19 (54.5%)	14 (42.4%)

Tetraciclina (TE); norfloxacin (NOR); cloranfenicol (C); ciprofloxacina (CIP); rifampicina (R); eritromicina (EM); penicilina (P); estreptomicina (S); vancomicina (VA). El término "otros enterococos" agrupan cepas de *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus* y *E. avium* (1 de cada uno) de origen clínico.

Tabla 9. Resistencia antimicrobiana por origen de la infección

ORIGEN / ANTIBIOTICO	TE	NOR	C	CIP	R	EM	P	S	VA
ORINA (N;%)	8 (50.0%)	9 (56.3%)	0 (0.0%)	12 (75%)	5 (31.3%)	0 (0.0%)	8 (50.0%)	8 (50.0%)	6 (37.5%)
<i>E. faecalis</i> (7 cepas)	57.1%	42.9%	0.0%	57.1%	28.6%	0.0%	14.3%	14.3%	14.3%
<i>E. faecium</i> (8 cepas)	50.0%	75.0%	0.0%	87.5%	37.5%	0.0%	87.5%	75.0%	62.5%
<i>E. durans</i> (1 cepa)	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%
SANGRE (N;%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)	3 (100.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0.0%)
LIQUIDOS (N;%)	3 (50.0%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)	5 (83.3%)	3 (50.0%)	5 (83.3%)	4 (66.7%)	4 (66.7%)	3 (50.0%)
CATETER (N;%)	2 (66.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (100.0%)	1 (33.3%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)	3 (100.0%)
ABSCESOS (N;%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)	2 (100.0%)
H. RECTAL (N;%)	0 (0.0%)	1 (33.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

Tetraciclina (TE); norfloxacin (NOR); cloranfenicol (C); ciprofloxacina (CIP) rifampicina (R); eritromicina (EM); penicilina (P); estreptomicina (S); vancomicina (VA); La clasificación líquidos incluye: líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido ascítico, líquido de diálisis peritoneal y otros; catéter incluye: catéter endovenoso y catéter venoso central. Abscesos incluye: absceso hepático, absceso intraabdominal.

5.2. Ensayos fenotípicos de virulencia

5.2.1. Determinación de la actividad gelatinasa

Se analizaron las cepas en agar nutritivo con 1% de gelatina y se obtuvieron 11 cepas positivas para la hidrólisis de la gelatina (Tabla 10). La cepa Efc27 (*E. faecalis*) fue la única de origen marino con un fenotipo positivo y con una baja actividad gelatinasa relativa (1.238 ± 0.082 R/r) en comparación con las demás cepas positivas. Mientras tanto 10 de las 33 cepas clínicas fueron positivas; 8 correspondieron a la especie *E. faecalis* y solo 2 cepas de *E. faecium* (cepa Efm07/13 y Efm12/20) presentaron el fenotipo positivo (Anexo 17 al 19).

Para determinar posibles diferencias significativas entre las medias de la actividad gelatinasa se compararon mediante el análisis estadístico *Kruskal-Wallis test* (análisis no paramétrico), ANOVA (análisis paramétrico) para el análisis simultáneo de 3 a más medias y *unpaired T-test* para 2 grupos de medias (Tabla 11). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre las medias de la actividad gelatinasa de las cepas aisladas de sangre (Act. gelatinasa media: 2.905; DS: 0.117), ni en las cepas aisladas en líquidos corporales (Act. gelatinasa media: 3.143; SD: 0.267). Sin embargo se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias de la actividad gelatinasa de enterococos aislados a partir de orina (Act. gelatinasa media: 3.038; SD: 0.998).

La mayor actividad gelatinasa se identificó en la cepa *E. faecalis* (cepa Efc22/21; muestra de orina) que presentó una actividad de 4.810 ± 0.082 (R/r), superior a la media de las demás. El 50% de las cepas clínicas positivas fueron aisladas a partir de orina; por otro lado 3 de estas cepas positivas se aislaron dentro de la unidad de cuidados intensivos (UCI) en muestras de líquido peritoneal, orina y otros fluidos (Figuras 3 y 4).

Tabla 10. Actividad gelatinasa relativa. Análisis por cepa (mm)

N°	CODIGO	ORIGEN	ESPECIE	D1 (mm)	D2 (mm)	D3 (mm)	Promedio (mm)	Act. Gel. (R/r)	DS
C+	Efc283	CLINICO	<i>E. faecalis</i>	20	18	18	18.667	2.667	0.165
1	Efc22/21	Orina	<i>E. faecalis</i>	34	33	34	33.667	4.810	0.082
2	Efc05/23	Orina	<i>E. faecalis</i>	19	22	21	20.667	2.952	0.218
3	Efc05/27	Orina	<i>E. faecalis</i>	14	13	14	13.667	1.952	0.082
4	Efm07/13	Orina	<i>E. faecium</i>	20	21	21	20.667	2.952	0.082
5	Efc06/05	Orina	<i>E. faecalis</i>	17	18	18	17.667	2.524	0.082
6	Efc03/22	Sangre	<i>E. faecalis</i>	20	20	20	20.000	2.857	0.000
7	Efc05/07	Sangre	<i>E. faecalis</i>	20	22	20	20.667	2.952	0.165
8	Efc13/20	LP	<i>E. faecalis</i>	24	23	24	23.667	3.381	0.082
9	Efc09/17	LCR	<i>E. faecalis</i>	22	19	20	20.333	2.905	0.218
10	Efc12/20	L	<i>E. faecium</i>	20	23	23	22.000	3.143	0.247
11	Efc27	MARINO	<i>E. faecalis</i>	9	8	9	8.667	1.238	0.082

Resultado de la actividad Gelatinasa en agar nutritivo (1% gelatina), ensayos con 3 repeticiones (D1,D2,D3). La lectura de los diámetros (en mm) en todos los casos se realizaron transcurridos las 24 horas. El diámetro menor es 7mm. Abreviatura: LP: líquido peritoneal; LCR: líquido cefalorraquídeo; L: Líquidos (otros).

Tabla11. Actividad gelatinasa relativa: análisis estadístico por grupos

ORIGEN	CEPAS	MEDIA (R/r)	DS	N	Nivel de significancia
Orina	Efc22/21	3.038	0.998	15	Kruskal-Wallis test Pvalue<0.001 (P<0.05) No existen diferencias
	Efc05/23				
	Efc05/27				
	Efm07/13				
	Efc06/05				
Sangre	Efc03/22	2.905	0.117	6	Unpaired t test Pvalue: 0.3739 (P>0.05) No existen diferencias
	Efc05/07				
Líquidos corporales	Efc13/20	3.143	0.267	9	ANOVA one- way Pvalue: 0.0663 (P>0.05) No existen diferencias
	Efc09/17				
	Efc12/20				

Análisis estadístico de la actividad gelatinasa de enterococos clínicos según su origen. Pruebas para comparar las diferencias entre medias y medianas de cada grupo según sea el caso; análisis no paramétrico: *krustal-wallis test* y para distribuciones normales (paramétricas): para 2 grupos *Unpaired t test* y Anova *one way* para 3 o más grupos (análisis en software GraphPad Prism6).

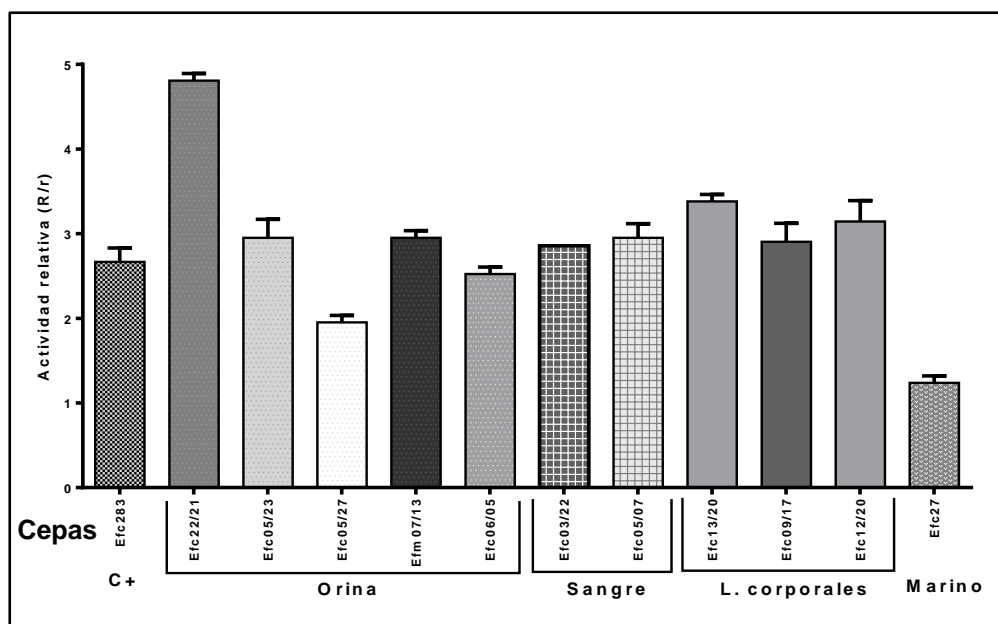


Figura 3. Actividad relativa gelatinasa de todas las cepas positivas; C+: Cepa positiva de referencia. Se observan por grupos de origen (Orina: 5 cepas; sangre: 2 cepas; L. corporales: 3 cepas). Se muestran las medias (columnas) y sus respectivas desviaciones estándares (barras).

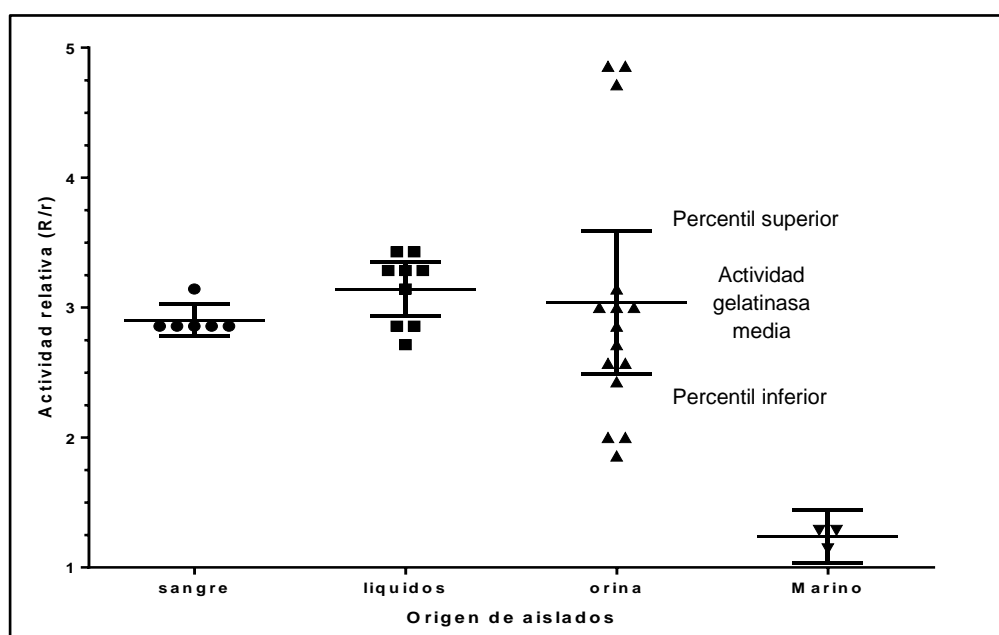


Figura 4. Actividad gelatinasa relativa según el tipo de muestra; distribución de todos los puntos (réplicas de cada cepa) agrupados por el origen de aislamiento (IC 95%); en sangre (2 cepas), líquidos corporales (3 cepas), orina (5 cepas) y marino (1 cepa).

5.2.2. Determinación de la actividad hemolítica

Se sembraron las cepas en agar TH suplementado con 5% de sangre humana desfibrinada por 48 horas en condiciones de microaerofilia (anexo 3 y 4). Ninguna cepa marina resultó ser betahemolítica (hemólisis completa), sin embargo algunas de estas cepas presentaron una degradación parcial (denominada *alpha* hemólisis) de la sangre en el agar, así por ejemplo 5 de las de *E. faecium* (correspondiente al 55.6% de la especie) y 4 cepas de *E. durans* (44.4% de la especie) son *alpha* hemolíticas. Por el contrario todas las *E. faecalis* y *E. hirae* (con la excepción de la cepa Eh23) resultaron no hemolíticas (Tabla 12; Anexo 22 al 24).

Los resultados de la prueba con enterococos clínicos mostraron 4 cepas positivas (*beta* hemólisis). Dentro de las *E. faecalis* se reportaron 3 cepas positivas aisladas a partir de orina y LCR, las 8 *E. faecalis* restantes se registraron como *gamma* hemolíticas. Una cepa de *E. faecium* resistente a vancomicina (Efm22/04) también presentó un fenotipo positivo, las restantes cepas de *E. faecium* resultaron negativas observándose 4 cepas con degradación parcial (*alpha* hemólisis) y 13 no hemolíticas (*gamma* hemólisis). Por otro lado *E. hirae* (cepa Eh118-4A) y *E. raffinosus* (cepa Ent189-11) son *alpha* hemolíticos, mientras que las cepas *E. durans* (cepa Ed118-4B) y *E. avium* (cepa Ent757-10) no son hemolíticas (Tabla 13).

Para establecer la selectividad hemolítica sobre sangre humana, sembramos las cepas que resultaron positivas en agar sangre suplementado con 5% de sangre de carnero e incubadas a las mismas condiciones descritas anteriormente. Los resultados de este ensayo mostraron que ninguna cepa positiva hemolizó sangre de carnero, ni se observó una hemólisis parcial (*alpha* hemólisis).

Tabla 12. Actividad hemolítica: enterococos marinos

ESPECIES	BETA HEMÓLISIS	ALPHA HEMÓLISIS	GAMMA HEMÓLISIS
<i>E. faecalis</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	7 (100.0%)
<i>E. faecium</i>	0 (0.0%)	5 (55.6%)	4 (44.4%)
<i>E. durans</i>	0 (0.0%)	4 (44.4%)	5 (55.6%)
<i>E. hirae</i>	0 (0.0%)	1 (11.1%)	8 (88.9%)
TOTAL	0 (0.0%)	10 (29.4%)	24 (70.6%)

Tipos de hemolisis sobre sangre humana, la beta hemólisis (hemolisis total) se considera positiva para la actividad de la hemolisina. Porcentaje de las columnas por especie, la fila de total indica el porcentaje por grupo.

Tabla 13 Actividad hemolítica: enterococos clínicos

ESPECIES	BETA HEMÓLISIS	ALPHA HEMÓLISIS	GAMMA HEMÓLISIS
<i>E. faecalis</i>	3 (27.3%)	0 (0%)	8 (72.7%)
<i>E. faecium</i>	1 (5.6%)	4 (22.2%)	13 (72.2%)
<i>E. hirae</i>	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
<i>E. durans</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)
<i>E. raffinosus</i>	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
<i>E. avium</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)
TOTAL	4 (12.1%)	6 (18.2%)	23 (69.7%)

Tipos de hemolisis sobre sangre humana, la beta hemólisis (hemolisis total) se considera positiva para la actividad de la hemolisina. Porcentaje de las columnas por especie, la fila de total indica el porcentaje por grupo.

5.2.3. Formación de biopelículas *in vitro*

Para realizar las primeras lecturas en las placas de microtitulación se determinó la concentración de glucosa que induciría la mayor producción del biopolímero. Se usaron 2 cepas de referencia (*S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 27853) a las cuales nos referimos como débil y fuertemente productoras de biopelículas respectivamente. Ambas cepas se incubaron en TSB, TSB con 0.5% de glucosa y TSB con 0.75% (w/v) del carbohidrato. Se realizaron 4 lecturas con 3 réplicas.

Se observó un incremento en la DO de los patrones conforme aumentó la concentración de glucosa (Anexo 5); con una concentración de 0.75%(w/v) la cepa *P. aeruginosa* (fuerte productor) registró una DO de 0.143 (± 0.006) frente a la DO de 0.043 (± 0.004) obtenida cuando se cultivó en TSB sin el carbohidrato. Mientras que para *S. aureus* (débil productor) el incremento entre las DO fue de apenas 0.006, (de una DO de 0.015 a 0.021) mostrándose que alcanzando una concentración de 0.75% de glucosa se expresó una mejor diferencia entre las lecturas de las 2 cepas de referencia.

El incremento del fenotipo observado con la adición de glucosa se verificó posteriormente (Anexo 7) con 3 cepas de estudio que mostraron un fenotipo: débil (cepa Efm12/20), moderado (cepa JH2-2) y fuerte (Cepa Efc05/23). Bajo las mismas condiciones de ensayo se comprobó una mejor discriminación entre las cepas fuertemente productoras, moderadas y débiles cuando se empleó TSB con 0.75% de glucosa. Para Efc05/23 (fuerte productor) mostró un incremento de 0.148 en la DO con relación a TSB sin el carbohidrato. De la misma forma la cepa JH2-2 (moderada productora) mostró un incremento de 0.011 en su DO cuando se empleó TSB con 0.75% de glucosa. Para la cepa Efm12/20 (débil productor) no hubo diferencias significativas cuando se adicionó glucosa en el TSB (Figura 5).

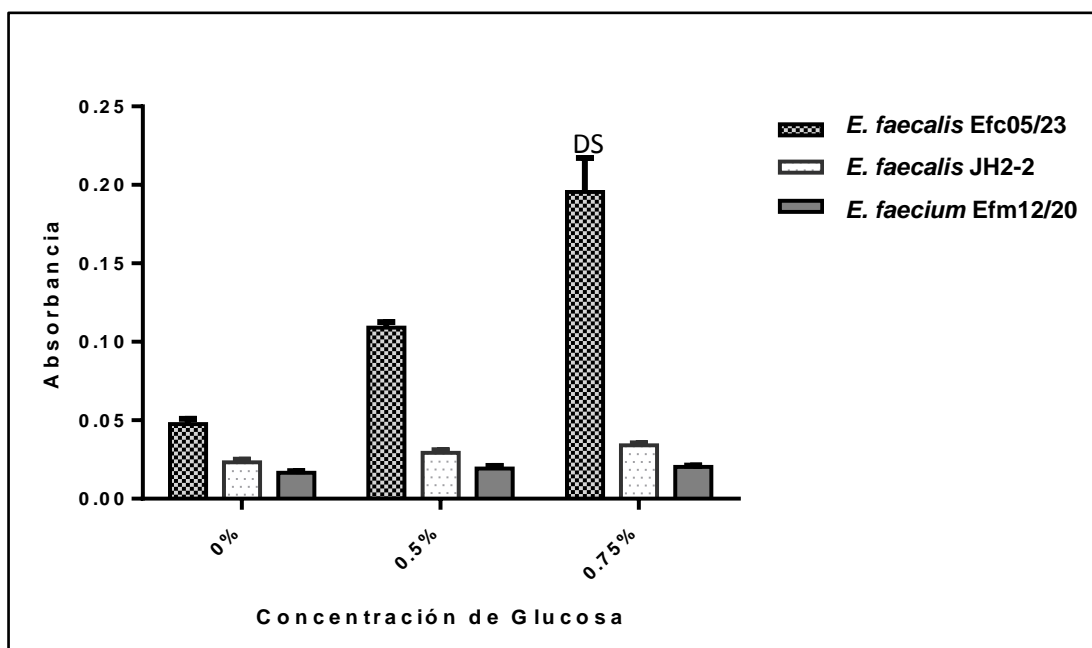


Figura 5. Formación de biopelículas: efecto de la concentración de la glucosa sobre la formación de biopelículas: cepas de control Efc05/23 (fuerte productor); JH2-2 (moderado productor) y Efm12/20 (débil productor). Absorbancia a 492 nm con 630 nm de referencia Columnas: absorbancia media, barras: desviación estándar (DS).

Los intervalos de clasificación de las biopelículas para establecer criterios de clasificación se determinaron mediante lecturas sucesivas de los controles con 3 réplicas y 4 repeticiones. Las placa de poliestireno conteniendo medio sin inocular, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 25923 fueron utilizados como controles para el *Cut off*, control positivo y control negativo respectivamente (anexo 6). Se denominaron cepas con un fenotipo débilmente productor cuando la DO es menor o igual a 0.022, para cepas con una DO mayor a 0.022 y menor o igual a 0.044 se le asignó un fenotipo moderado, mientras que en cepas con una DO mayores a 0.044 se les denominaron cepas fuertemente productoras. Para cepas con lecturas menores a 0.011 los resultados fueron rechazados y se volvieron a repetir los procedimientos.

Las cepas *E. faecalis* de origen marino (Tabla 14) expresaron un 42.9% un fenotipo fuerte (3 cepas) y un 57.1% (4 cepas) el fenotipo moderado. Ninguna produjo una biopelícula débil. Se reportaron para las cepas Efc42 y Efc43 las mayores absorbancias (con valores de 0.077 ± 0.005 y 0.087 ± 0.004 respectivamente). Una cepa de *E. faecium* (Efm66) resultó ser fuerte productor de biopelícula (DO: 0.070 ± 0.005). En tanto el 33.3% (3 cepas) de *E. faecium* marino poseía un fenotipo moderado y el 55.6% (5 cepas) se catalogaron como débiles productoras. Por otro lado Ed32 expresó el fenotipo fuerte con la mayor DO registrada entre las cepas marinas (0.154 ± 0.013) y junto a Ed10 son las 2 únicas cepas fuertemente productoras entre las *E. durans* (22.2%). Las otras 4 cepas (44.4%) y 2 cepas (22.2%) son moderadas y débilmente formadoras respectivamente.

En el mismo ensayo realizado con las cepas clínicas (Tabla 15) todas las cepas de *E. faecalis* (11 cepas) presentaron un fenotipo fuerte. Las cepas Efc188/11, Efc05/23 y Efc06/05 aisladas a partir de muestras de orina, tienen la mayor producción de biopolímeros (DO: 0.278 ± 0.023 ; 0.187 ± 0.004 y 0.166 ± 0.017), las dos primeras pertenecen a pacientes internados en la UCI. En general *E. faecium* clínico (con excepción de Efm07/13) son débiles (66.7% de las cepas) a moderados (27.8% de las cepas) productores de biopelículas en nuestros ensayos; aun cuando contradictoriamente Efm06/09 (moderado), Efm27/08 y Efm02/12 (débiles) originalmente fueron aislados de catéteres endovenosos y venoso central de la UCI.

Por otro lado *E. hirae* (cepa Eh188-4A), presenta un fenotipo moderado, mientras que *E. durans* (cepa Ed188-4B) *E. raffinosus* (cepa Ent189-11) y *E. avium* (cepa Ent757-10) son débiles productores en las placas de poliestireno (Anexo 20 y 21).

Tabla 14. Tipificación de biopelículas: enterococos marinos

ESPECIE/TIPO	DÉBIL	MODERADO	FUERTE
<i>E. faecalis</i>	0 (0.0%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)
<i>E. faecium</i>	5 (55.6%)	3 (33.3%)	1 (11.1%)
<i>E. durans</i>	2 (22.2%)	5 (55.6%)	2 (22.2%)
<i>E. hirae</i>	0 (0.0%)	6 (66.7%)	3 (33.3%)
TOTAL	7 (20.6%)	18 (52.9%)	9 (26.5%)

Tipificación de biopelículas: débil, moderado y fuerte en el grupo de enterococos marinos. Número y porcentaje en las columnas por cada especie.

Tabla 15. Tipificación de biopelículas: enterococos clínicos

ESPECIE/PORCENTAJE	DÉBIL	MODERADO	FUERTE
<i>E. faecalis</i>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	11 (100.0%)
<i>E. faecium</i>	12 (66.7%)	5 (27.8%)	1 (5.6%)
<i>E. hirae</i>	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)
<i>E. durans</i>	1 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>E. raffinosus</i>	1 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>E. avium</i>	1 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
TOTAL	15 (45.4%)	6 (18.2%)	12 (36.4%)

Tipificación de biopelículas: débil, moderado y fuerte en el grupo de enterococos clínicos. Número y porcentaje en las columnas por cada especie; fila de Total: número y porcentaje por cepas clínicas.

5.3. Ensayos moleculares de virulencia

En el análisis molecular de virulencia de los enterococos marinos (Tabla 16) se observaron 3 perfiles de virulencia que involucraron a los marcadores *gelE*⁺ y *esp*⁺. Seis de las siete cepas de *E. faecalis* (85.8%) poseen estos marcadores. Así por ejemplo el perfil de virulencia *gelE*⁺ y *esp*⁺ están presentes en igual proporción (42.9% de los *E. faecalis* marinos). Una cepa de *E. faecium* (11.1%), con una débil producción de biopelícula y gelatinasa negativa, tiene el perfil de virulencia *esp*⁺/*gelE*⁺; mientras que la cepa Efm70 posee únicamente el marcador *gelE*⁺ y un fenotipo negativo de gelatinasa con producción moderada de biopelícula. Las siete cepas restantes (77.8% de las *E. faecium* marinos) no poseen ninguno de los marcadores buscados en esta investigación. Los *E. durans* marinos (cepas Ed10 y Ed32) son portadores del marcador *gelE*⁺ aun cuando no presentan un fenotipo positivo para la actividad gelatinasa; mientras que las 7 cepas restantes (77.78% de las *E. durans* marinos) y todas las *E. hirae* (9 cepas) carecían de los marcadores de virulencia que se investigaron en este trabajo.

Por el contrario los enterococos clínicos presentaron una mayor diversidad en sus perfiles de virulencia (Tabla 17). Las cepas clínicas de *E. faecalis* se identificaron como las más virulentas, hasta con la combinación de 3 marcadores. Solo 2 cepas (Efc08/24 y Efc188-11) de las 11 *E. faecalis* evaluadas carecen de *gelE*⁺, pero presentan el marcador *esp*⁺. El perfil *esp*⁺/*cylA*⁺/*gelE*⁺ se identificó en el 18.2% de estas cepas (cepas Efc09/17 y Efc05/26) y además expresaron los respectivos fenotipos a los cuales están asociados (con excepción de la actividad gelatinasa en la última cepa). Los perfiles *esp*⁺/*gelE*⁺ y *cylA*⁺/*gelE*⁺ estaban presentes en el 18.2% (cepas Efc06/05 y Efc05/27) y 9.1% (cepa Efc22/21) respectivamente. Todas las

cepas portadoras de *cylA* son betahemolíticas. No se detectó el marcador *hyl+* en esta especie de enterococo.

Tabla 16. Perfil molecular de virulencia: enterococos marinos

PERFIL	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	TOTAL
<i>esp+/gelE</i>	0 (0.0%)	1 (11.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (2.9%)
<i>esp+</i>	3 (42.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (8.8%)
<i>gelE+</i>	3 (42.9%)	1 (11.1%)	2 (22.2%)	0 (0.0%)	6 (17.6%)
N/A	1 (14.3%)	7 (7.8%)	7 (7.8%)	9 (100.0%)	24 (70.6%)

Perfiles de virulencia identificados en el grupo marino. Se expresan el porcentaje de los perfiles de virulencia por especie de enterococo y por todo el grupo marino. N/A: no presentan los marcadores de virulencia estudiados.

Tabla 17. Perfil molecular de virulencia: enterococos clínicos

PERFIL	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	otros enterococos	TOTAL
<i>esp+/cylA+/gelE+</i>	2 (18.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (6.7%)
<i>esp+/hyl+</i>	0 (0.0%)	3 (16.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (9.1%)
<i>esp+/gelE+</i>	2 (18.2%)	1 (5.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (9.1%)
<i>cylA+/gelE+</i>	1 (9.1%)	1 (5.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (6.7%)
<i>cylA+</i>	0 (0.0%)	1 (5.6%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (3.0%)
<i>esp+</i>	2 (18.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (6.7%)
<i>gelE+</i>	4 (36.4%)	4 (22.2%)	0 (0.0%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	9 (27.8%)
N/A	0 (0.0%)	8 (44.4%)	1 (100.0%)	0 (0.0%)	2 (100.0%)	11 (33.3%)

Perfiles de virulencia identificados en el grupo clínico. Se expresan el porcentaje de los perfiles de virulencia por especie de enterococo y por todo el grupo clínico. N/A: no presentan los marcadores de virulencia estudiados.

En las 18 cepas de *E. faecium* aisladas, el 44.4% (8 cepas) no presentaron ninguno de los marcadores estudiados. Por otro lado en todos los casos donde se detectó el marcador *hyl*⁺ (3 cepas) siempre estuvo asociado al marcador *esp*⁺ (perfil *esp*⁺/*hyl*⁺) y con elevados niveles de resistencia a vancomicina, el cual representó el 25% de todas las *E. faecium* EVR. El marcador *cyIA*⁺, con una prevalencia del 11.1% de los *E. faecium* aislados clínicamente, estuvo presente en la cepa betahemolítica Efm22/04 (perfil *cyIA*⁺/*gelE*⁺) y la cepa no hemolítica Efm09/22 (perfil *cyIA*⁺).

Efm07/13 carece de *esp*⁺, y sin embargo es la mayor productora de biopelícula de todas las *E. faecium* clínicas evaluadas (DO: 0.117) pero es portadora del marcador *gelE*⁺, con una actividad gelatinasa relativa de 2.952 (R/r). Mientras que el marcador *esp*⁺ siempre acompañado de otro marcador (*esp*⁺/*hyl*⁺ en el 16.7% y *esp*⁺/*gelE*⁺ en el 5.6% de los *E. faecium* clínicos) en ninguno de los casos está asociado con un fenotipo de biopelícula fuerte. Dentro del grupo de otros enterococos, *E. hirae* clínico (cepa Eh188-4A) presentó el perfil *gelE*⁺ aun cuando la actividad gelatinasa no fue detectada, el resto de las cepas clínicas de enterococos carecieron de los marcadores de virulencia evaluados.

Se relacionó la capacidad de formar biopelículas con la presencia de los marcadores *gelE* y *esp* en ambos grupos (Tabla 18; Figuras 6 y 7). Para *E. faecalis* la presencia de *esp*⁺ y *gelE*⁺ estaba relacionado con un fenotipo fuerte y en mayor proporción en las clínicas frente a las de origen marino. En *E. faecalis* de ambos grupos la presencia *esp* elevó considerablemente los niveles de producción de biopelículas, prevalentemente en cepas clínicas sobre marinas; en tanto que *gelE* solo favoreció a una mayor producción en el grupo clínico. En el grupo marino la presencia de *gelE* apenas mostró diferencias con respecto a las cepas que carecen de estos marcadores, en donde todas las cepas con la excepción Efc17 (gelatinasa positiva y fuerte productor de biopelícula) son moderadas productoras.

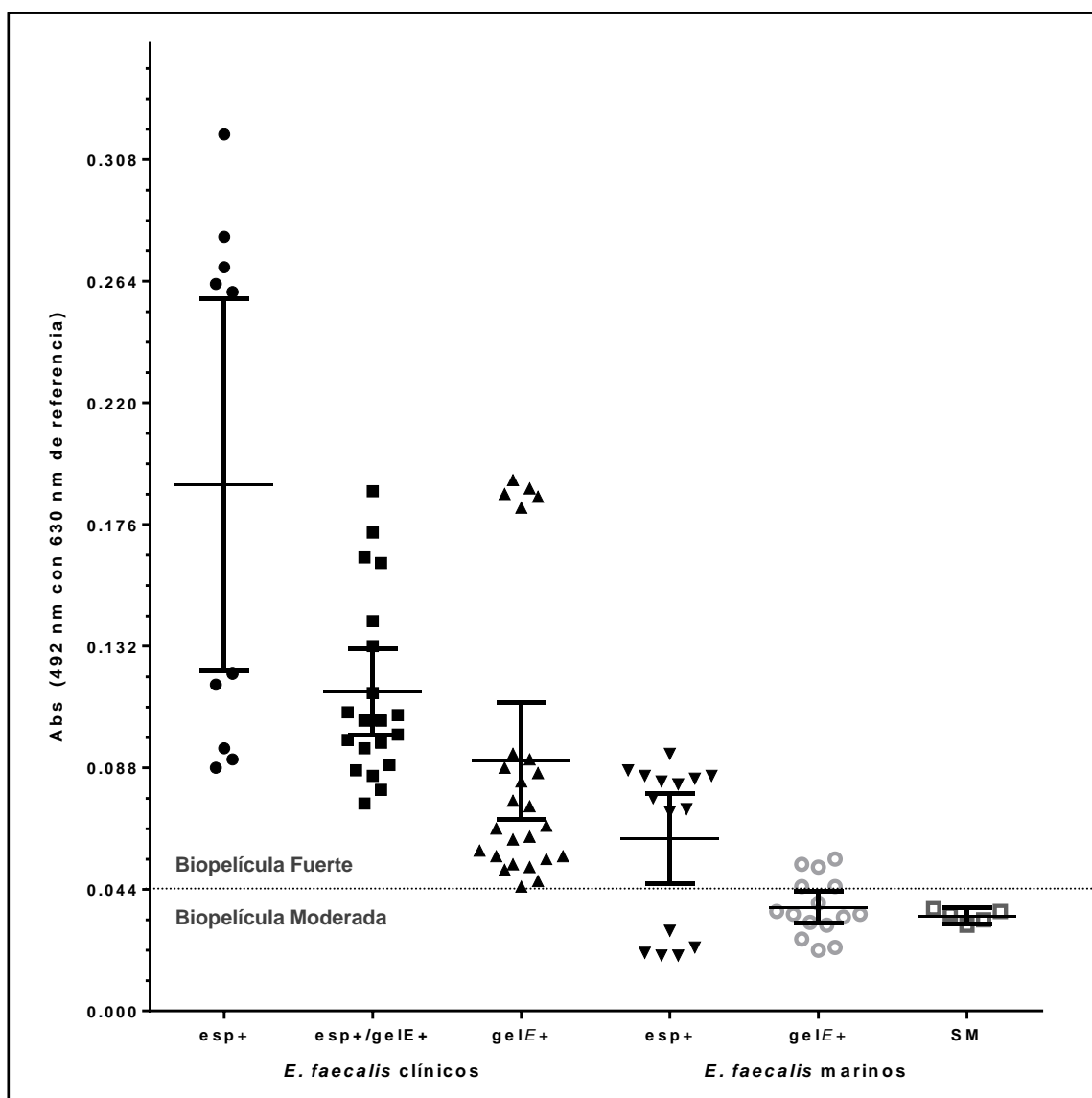


Figura 6. Formación de biopelículas en *E. faecalis* por perfiles de virulencia, distribución de todos los puntos (réplicas) de absorbancia (492 nm con 630 nm de referencia) por perfiles de virulencia (IC 95%) y por origen; *E. faecalis* clínicos (11 cepas) y *E. faecalis* marinos (7 cepas). Las viñetas representan los valores de absorbancia de las réplicas por cada perfil molecular de virulencia presentes en ambos grupos.

En el caso de *E. faecium* la presencia de *esp* no influyó sobre la expresión de un fenotipo moderado o fuertemente productor tanto en el grupo clínico como el marino y por el contrario tuvo una débil biopelícula, más ante la presencia de *gelE* se observó que este marcador favorecía ligeramente la expresión de un fenotipo moderado (Figura 7). Contrariamente la única cepa con el fenotipo fuertemente productor (Efm66) carecía de *esp* y *gelE*.

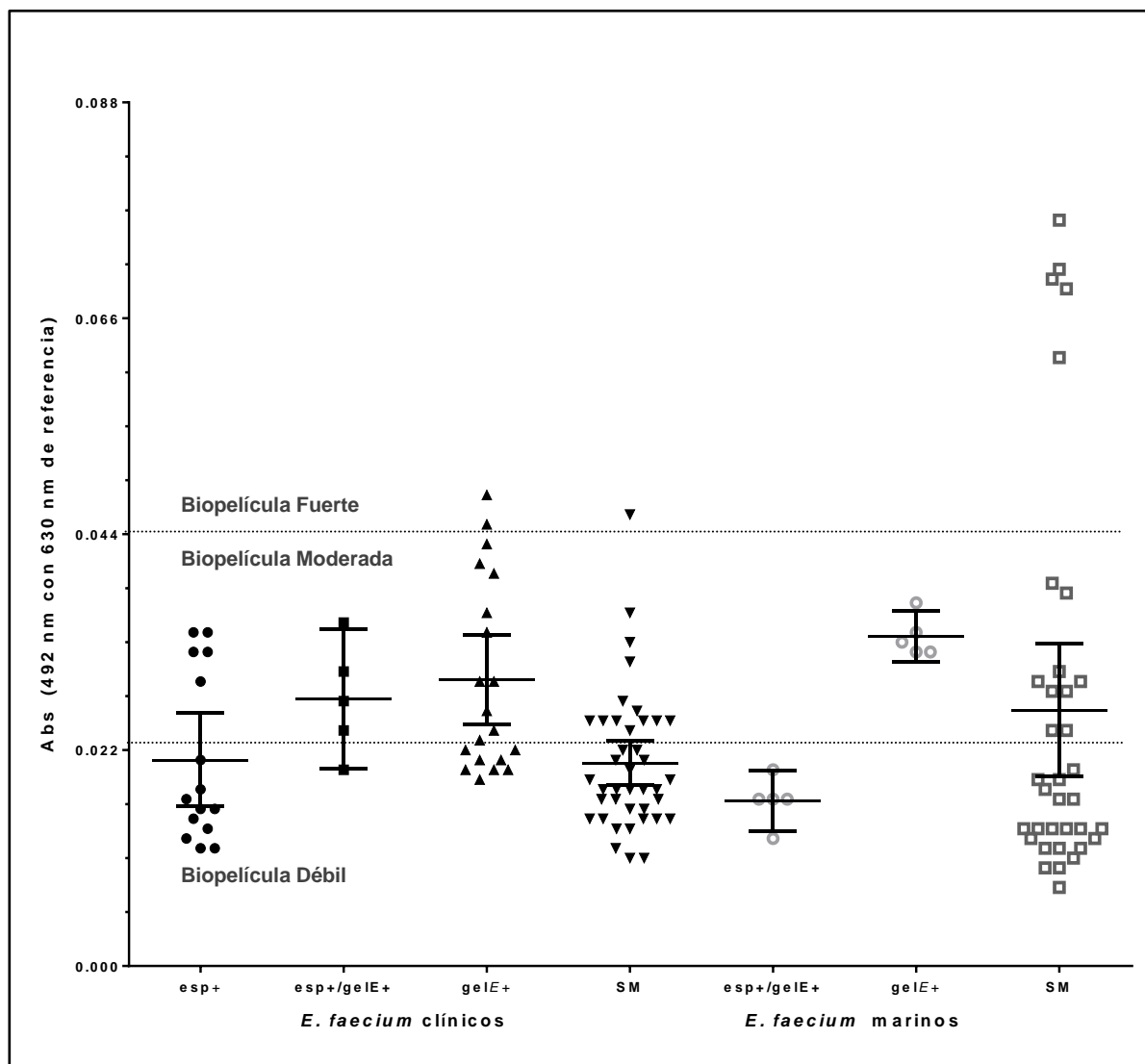


Figura 7. Formación de biopelículas en *E. faecium* por perfiles de virulencia, distribución de todos los puntos (réplicas) de absorbancia (492 nm con 630 nm de referencia) por perfiles de virulencia (IC 95%) y por origen; *E. faecium* clínicos (18 cepas) y *E. faecium* marinos (9 cepas). Las viñetas representan los valores de absorbancia de las réplicas por cada perfil molecular de virulencia presentes en ambos grupos.

Tabla 18. Tabla de contingencia: marcadores vs. Tipo de biopelícula

ENTEROCOCOS MARINOS N (%)					ENTEROCOCOS CLÍNICOS N (%)				
PERFIL	ESPECIE	BIOPELÍCULA			PERFIL	ESPECIE	BIOPELÍCULA		
		DÉBIL	MODERADO	FUERTE			DÉBIL	MODERADO	FUERTE
<i>esp</i> ⁺ / <i>gelE</i> ⁺	<i>E. faecalis</i>				<i>esp</i> ⁺ / <i>gelE</i> ⁺	<i>E. faecalis</i>			4 (36.4)
	<i>E. faecium</i>	1 (11.1)				<i>E. faecium</i>		1 (5.56)	
	<i>E. hirae</i>					<i>E. hirae</i>			
	<i>E. durans</i>					Otros			
<i>esp</i> ⁺	<i>E. faecalis</i>		1 (14.3)	2 (28.6)	<i>esp</i> ⁺	<i>E. faecalis</i>			2 (18.2)
	<i>E. faecium</i>					<i>E. faecium</i>	2 (11.1)	1 (5.6)	
	<i>E. hirae</i>					<i>E. hirae</i>			
	<i>E. durans</i>					Otros			
<i>gelE</i> ⁺	<i>E. faecalis</i>		2 (28.6)	1 (14.3)	<i>gelE</i> ⁺	<i>E. faecalis</i>			5 (45.5)
	<i>E. faecium</i>		1 (11.1)			<i>E. faecium</i>	2 (11.1)	2 (11.1)	1 (5.6)
	<i>E. hirae</i>					<i>E. hirae</i>		1 (100.0)	
	<i>E. durans</i>			2 (22.2)		Otros			
Sin marcadores	<i>E. faecalis</i>		1 (14.3)		Sin marcadores	<i>E. faecalis</i>			
	<i>E. faecium</i>	4 (44.4)	2 (22.2)	1 (11.1)		<i>E. faecium</i>	8 (44.4)	1 (5.6)	
	<i>E. hirae</i>		7 (66.7)	3 (33.3)		<i>E. hirae</i>			
	<i>E. durans</i>	2 (22.2)	6 (55.6)			Otros	3 (100.0)		

Relación entre los marcadores (*esp* y *gelE*) y el tipo de biopelícula formada en ambos grupos de enterococos; N: número de cepas positivas por especie; %: porcentaje por especie

5.4. Ensayo de Mortalidad en *G. mellonella*

Inoculamos en grupos de 20 larvas diversas dosis de las cepas de control: Efc283 (una cepa patógena) y Ed90 (una cepa avirulenta) controlando la mortalidad por 72 horas con un monitoreo cada 8 horas. Con los datos se construyeron las gráficas de supervivencia de Kaplan–Meier en el programa *GraphPad Prism* (versión 6.0; *GraphPad Software*) y se compararon las curvas obtenidas con el test de *Log-rank* (Mantel-Cox) y Gehan-Breslow-Wilcoxon para determinar las posibles diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las gráficas construidas.

Las curvas de supervivencia construidas (Anexos 8 y 9) no son significativamente diferentes cuando se emplearon la dosis de 10^4 UFC/larva ($P_{\text{valor}} = 0.5603$) y 10^5 UFC/larva ($P_{\text{valor}} = 0.0596$), con una mortandad muy inferior al 50%, los resultados se aproximaron a la curva del control de inoculación. Por otro lado cuando se inoculó una mayor dosis de 10^7 UFC/larva (Anexo 11) la mortandad del 100% se alcanzó por completo antes de las 64 horas sin discriminación entre la capacidad de virulencia propia de las cepas y sin diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}} = 0.1162$). Al emplear la dosis más efectiva de 10^6 (UFC/larva) si se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}} < 0.0001$) y la mortalidad ocasionada (Anexo 10), con una mortalidad para Efc283 de casi el 100% a las 64 horas en tanto que la cepa Ed90 presentó una mortandad de inferior al 20% de las larvas observando diferencias estadísticas tanto en el modelo de Log-rank como en el de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Todos los ensayos posteriores de mortalidad se realizaron empleando la dosis efectiva (10^6 UFC/larva) en ambos grupos (Anexos 12 y 13). Se evaluaron 14 cepas marinas (7 de *E. faecalis*; 3 de *E. faecium*; 2 de *E. hirae* y 2 de *E. durans*) y 18 enterococos clínicos (6 de *E. faecalis*; 8 de *E. faecium* y una cepa de *E. hirae*, *E. durans*, *E. avium* y *E. raffinosus*)

La inoculación de *E.faecalis* marino (perfil *esp*⁺) presentó una virulencia moderada con una mortalidad máxima alcanzada a las 48 horas (Figura 8). Mientras Efc43 (Bp++) presentó una mortalidad ligeramente mayor (35%) sobre el 30% de mortandad de las cepas Efc18 (Bp+) y Efc42 (Bp++). Sin embargo no se observan diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}}=0.9551$).

Se compararon además las curvas de supervivencia de 3 cepas que presentaron el marcador *gelE*⁺: Efc17, Efc92 y Efc27 (*gelE*⁺, gelatinasa positiva). No se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Efc17 y Efc92 ($P_{\text{valor}} = 0.9565$) y ninguna supera el 25% de mortalidad (Baja mortandad). Mientras que Efc27 disminuye la supervivencia de *G. mellonella* hasta el 25% (Alta mortandad) con una supervivencia media alcanzada a las 48 horas es la cepa más patógena dentro del grupo de enterococos marinos (Figura 9). Por el contrario las cepas Efc26, Efm66 y Eh40 (sin marcadores de virulencia; Figura 10) se compararon para establecer su patogenicidad y ninguna de las cepas superó el 25% de mortalidad ni se observaron diferencias significativas entre las 3 cepas ($P_{\text{valor}}= 0.9565$).

Por otro lado la mayor mortalidad se observó dentro del grupo de enterococos clínicos bajo el perfil de virulencia *cylA*⁺/*esp*⁺/*gelE*⁺ (Figura 11) presente en las cepas Efc09/17(Gelatinasa positiva) y Efc05/26 (gelatinasa negativa) con una supervivencia media de 28 y 32 horas respectivamente. En ambos casos la mortandad alcanza el 100% en 48 y 56 horas. Las cepas Efm09/22 (*cylA*⁺) tiene una supervivencia media de 56 horas, mientras que las cepas con el perfil de virulencia *cylA*⁺/*gelE*⁺: cepas Efc22/21 (GEL+; BH+; BP++) y Efm22/04 (BH+; BP+) presentaron una supervivencia media de 33 y 40 horas respectivamente Las curvas de supervivencia (Figura 12) son significativamente diferentes entre las 3 cepas ($P_{\text{valor}}= 0.0013$).

Los enterococos con el perfil: *esp*⁺/*hyl*⁺ corresponden a *E. faecium* EVR, con una supervivencia media de 48 horas (Cepa Efm06/09) y 56 horas (cepas Efm18/18 y Efm02/12) Presentando graficas de supervivencia estadísticamente similares ($P_{\text{valor}}=0.4195$; Figura 13). Por otro lado cuando evaluamos 3 cepas (Efc05/23, Efm12/20 y Efm07/13; Figura 14) con actividad gelatinasa positiva (perfil *gelE*⁺) la supervivencia media fue igual a 40 horas y no se observaron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}}=0.1984$), aun cuando corresponden a especies diferentes (1 de *E. faecalis* y 2 de *E. faecium*) la mortalidad es superior al 65% .

Los perfiles *esp*⁺ (cepa Efc08/24) y *esp*⁺/*gelE*⁺ (cepas Efc06/05 y Efm10/13) se compararon se constuyeron las curvas de supervivencia Kaplan-Meier (Figura 15). La mayor virulencia en este grupo se observó en la cepa Efc06/05, la única con actividad gelatinasa positiva y con una supervivencia media de 32 horas obtuvo una mortalidad del 100% a las 64 horas. Por el contrario no se observaron diferencias significativas ($P_{\text{valor}}=0.9436$) entre las curvas de supervivencia de las cepas Efc08/24 (Bp++) y Efm10/13 (Bp+), las cuales no superaron el 50% de mortandad.

La figura 16 muestra comparativamente la patogenicidad de 3 perfiles de virulencia presentes en *E. faecalis*: *cylA*⁺/*esp*⁺/*gelE*⁺ (Efc09/17); *cylA*⁺/*gelE*⁺ (Efc22/21) y *esp*⁺ (Efc08/24). Todos los marcadores expresaron el fenotipo al que están asociados. El análisis Log-rank demuestra que las curvas de supervivencias son diferentes entre sí ($P_{\text{valor}}<0.0001$). La mortandad se inicia en menor tiempo cuando *esp*⁺ y su fenotipo están presentes. La supervivencia media solo está definida para Efc09/17 (28 horas) y Efc22/21 (32 horas).

Luego comparamos las cepas *E. faecalis* gelatinasa positiva tanto de origen marino (Efc27) como clínico (Efc05/23). La mortalidad empieza 24 horas después de la inoculación alcanzando una supervivencia media en 40 y 48 horas respectivamente (figura 17). Ambas curvas de supervivencia son significativamente diferentes ($P_{\text{valor}}=0.0138$). Trascurridas las 64 horas Efc05/23 alcanzó una mortalidad cercana al 100% (mayor mortandad), mientras que Efc27 obtuvo una mortandad del 70%.

En *E. faecium* (Figura 18) el perfil *esp*⁺/*gelE* estuvo presente tanto en la cepa marina Efm14 como en Efm10/13 de origen clínico. Se observó una baja virulencia en estas cepas y no se hallaron diferencias significativas entre las curvas de Kaplan-Meier ($P_{\text{valor}}=0.3113$), la supervivencia luego de 64 horas fue superior al 50%. Otros enterococos reconocidos por su baja virulencia (Figuras 19 y 20) mostraron que la mortandad ocasionada no sobrepasan el 25% de mortandad.

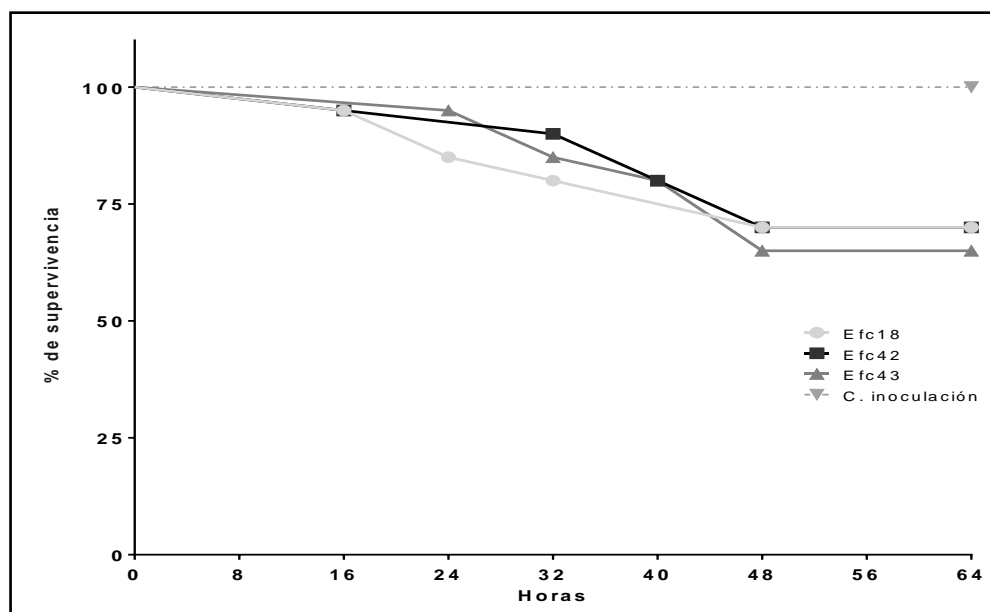


Figura 8. Virulencia de enterococos marinos (perfil *esp*⁺), curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas marinas de *E. faecalis* (perfil *esp*⁺): cepas Efc18 (Bp+), Efc42 y Efc43 (Bp++). No se observan diferencias significativas en las curvas de supervivencia ($P_{valor}=0.9551$). La mortalidad no supera el 50% de la población.

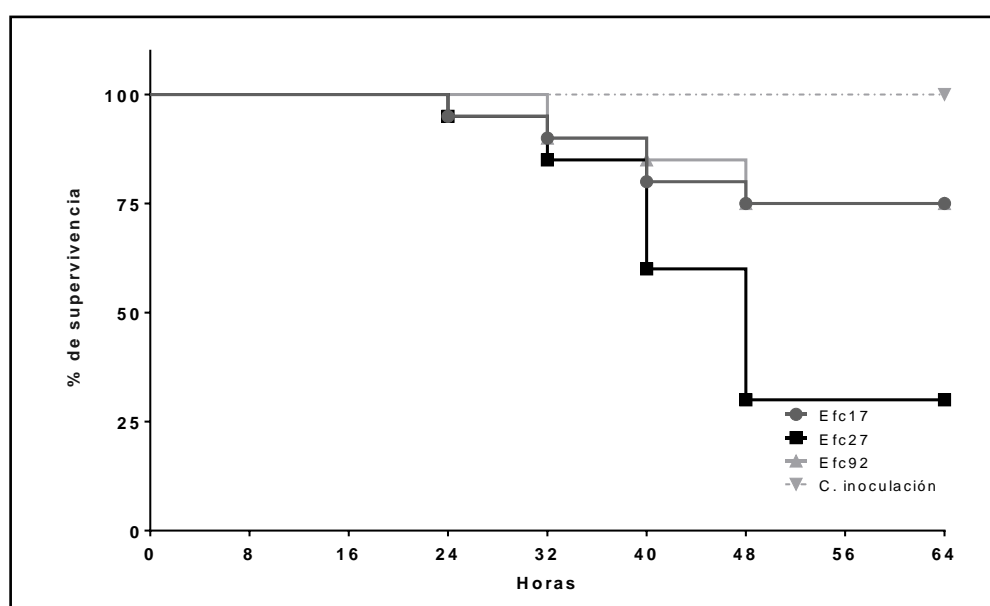


Figura 9. Virulencia de enterococos marinos (perfil *gelE*⁺), curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas marinas de *E. faecalis* (perfil *gelE*⁺): cepas Efc17 (Bp++), Efc27 (gelatinasa positiva; Bp+) y Efc92 (Bp+). No se observan diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de Efc17 y Efc92 (ambas gelatinasa negativa; $P_{valor}= 0.9565$). La mayor mortalidad está presente en Efc27 (mortalidad= 75%) La supervivencia media (Sup_{media}) se alcanza a las 48 horas.

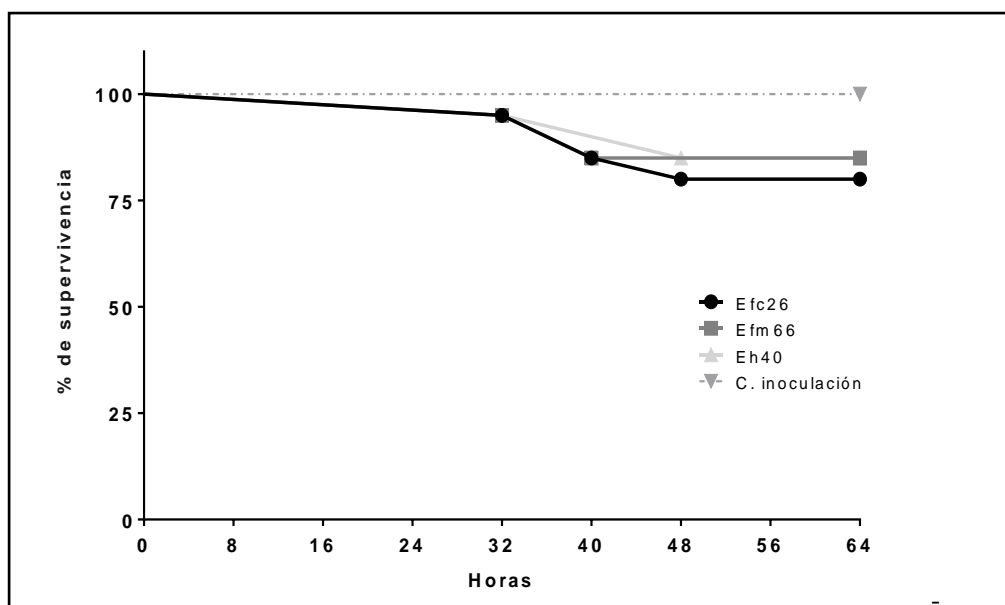


Figura 10. Virulencia de enterococos marinos (perfil: sin marcadores), curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas marinas (perfil sin marcadores): cepas Efc26 (Bp+), Efm66 y Eh40 (Bp++). No se observan diferencias significativas en las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}}=0.8885$). La mortalidad no supera el 75% de la población.

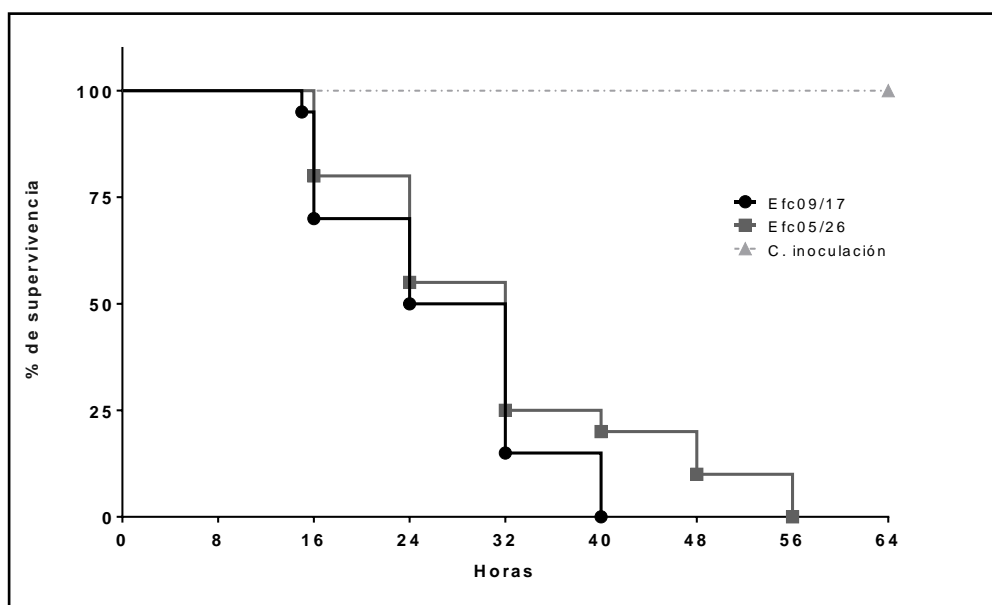


Figura 11. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: $cylA^+/esp^+/gelE^+$), curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos. Perfil $cylA^+/esp^+/gelE^+$: cepas Efc09/17 (GEL+; BH+; BP++) y Efc05/26 (BH+; BP++). Las curvas de supervivencia no son significativamente diferentes ($P_{\text{valor}}=0.1603$). La Sup_{media} para las cepas son 28 y 32 horas respectivamente.

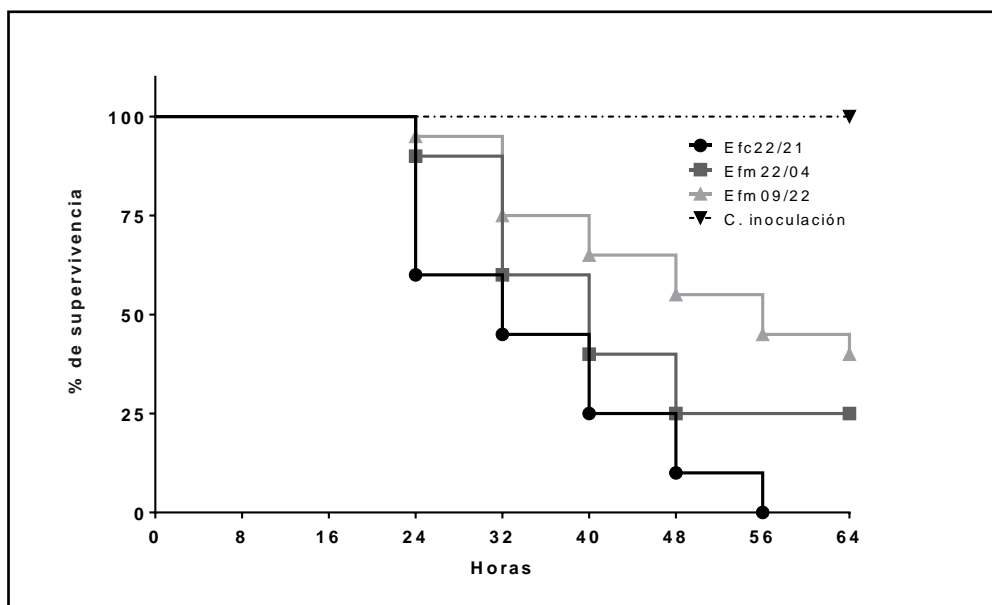


Figura 12. Virulencia de enterococos clínicos (perfiles: $cyIA^+$; $cyIA^+/gelE^+$), curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos. Perfil $cyIA^+$: cepa Efm09/22; Perfil $cyIA^+/gelE^+$: cepas Efc22/21 (GEL; BH+; BP++) y Efm22/04 (BH+; BP+). La supervivencia media para Efc22/21, Efm22/04 y Efm09/22 es 33, 40 y 56 horas respectivamente. Las curvas de supervivencia son significativamente diferentes entre Efc22/21 y Efm22/04 ($P_{valor}=0.0365$) y entre las 3 cepas ($P_{valor}= 0.0013$).

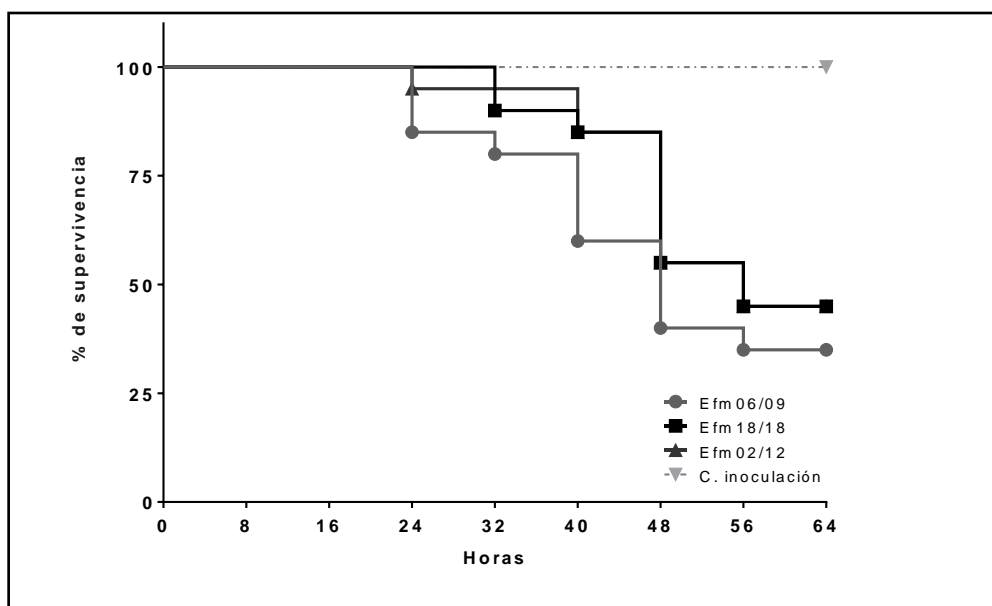


Figura 13. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: esp^+/hyl^+), curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos. Perfil: esp^+/hyl^+ . Cepa Efm06/09 (BP+; Sup.media: 48 horas), cepas Efm18/18 y Efm02/12 (Sup.media: 56 horas). Las curvas de supervivencia no son significativamente diferentes ($P_{valor}=0.4195$).

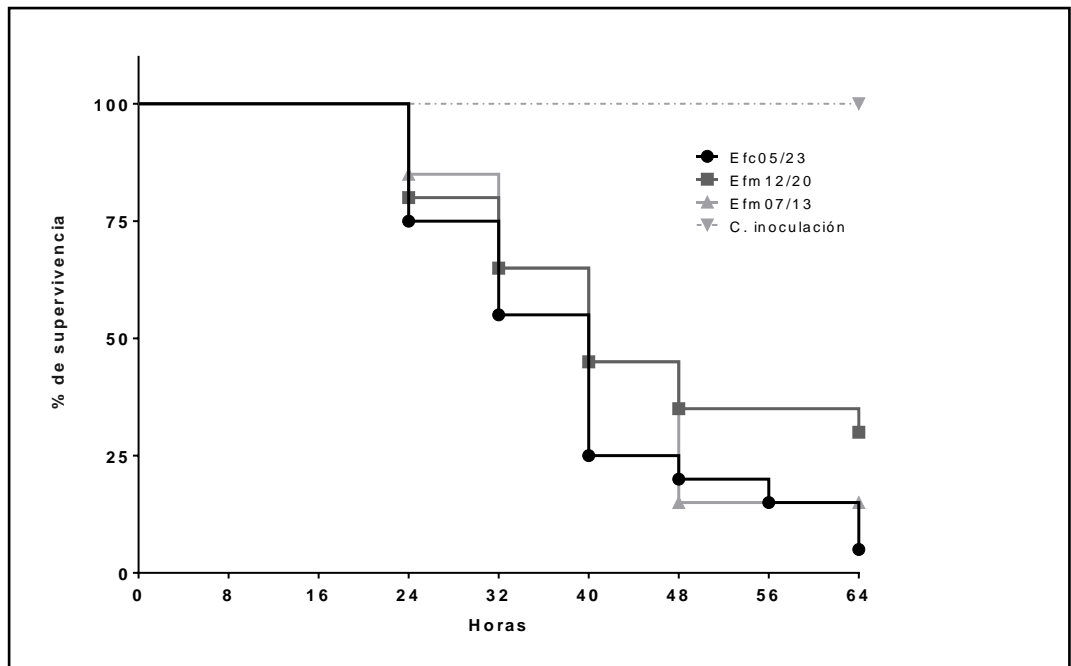


Figura 14. Virulencia de enterococos clínicos (perfil: *gelE*⁺), curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos. Perfil: *gelE*⁺. La supervivencia media para las 3 cepas es de 40 horas. Las curvas de supervivencia no son significativamente diferentes ($P_{\text{valor}}=0.1984$).

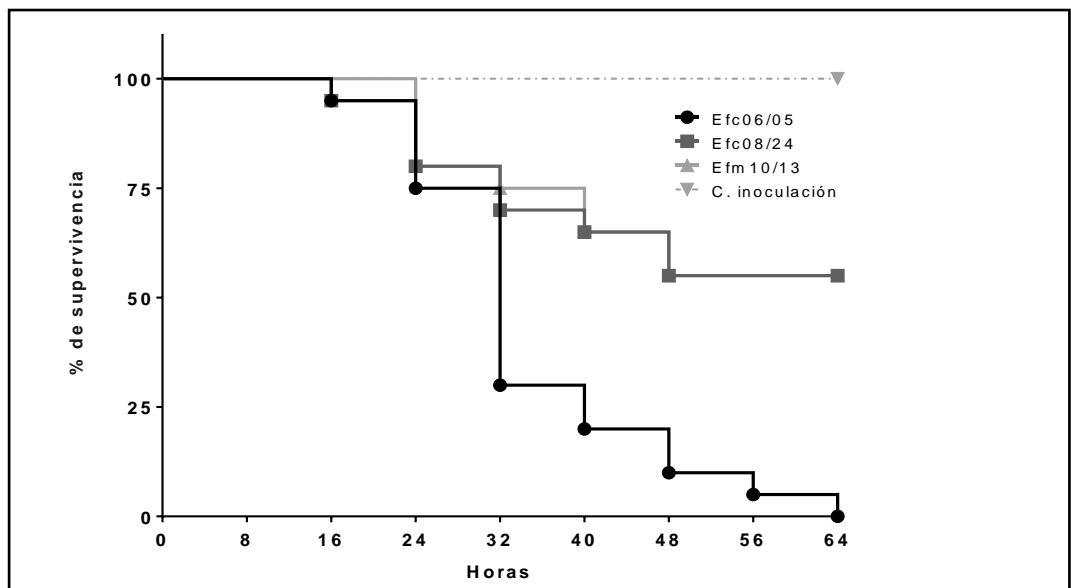


Figura 15. Virulencia de enterococos clínicos (Perfil: *esp*⁺; *esp*⁺/*gelE*⁺), curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos. Perfiles: *esp*⁺ (cepa Efc08/24) y *esp*⁺/*gelE*⁺ (cepas Efc06/05 y Efm10/13). No existen diferencias significativas ($P_{\text{valor}}=0.9436$) entre las curvas de supervivencia de las cepas Efc08/24 (Bp++) y Efm10/13 (Bp+; $\text{Sup}_{\text{media}}=40$ horas).

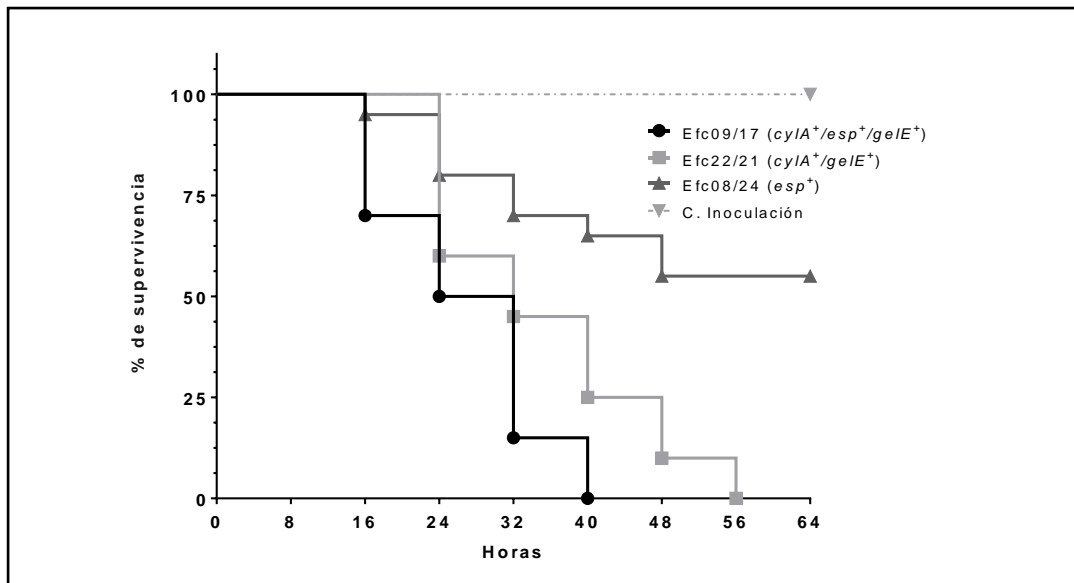


Figura 16. Comparación de la letalidad de los marcadores; *cylA*⁺, *esp*⁺ y *gelE*⁺, curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos. Perfiles: *cylA*⁺/*esp*⁺/*gelE*⁺ (Efc09/17); *cylA*⁺/*gelE*⁺ (Efc22/21) y *esp*⁺ (Efc08/24). Todos los marcadores expresan el fenotipo al que están asociados. Existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}} < 0.0001$) Sup._{media}: Efc09/17 (28 horas), Efc22/21 (32 horas).

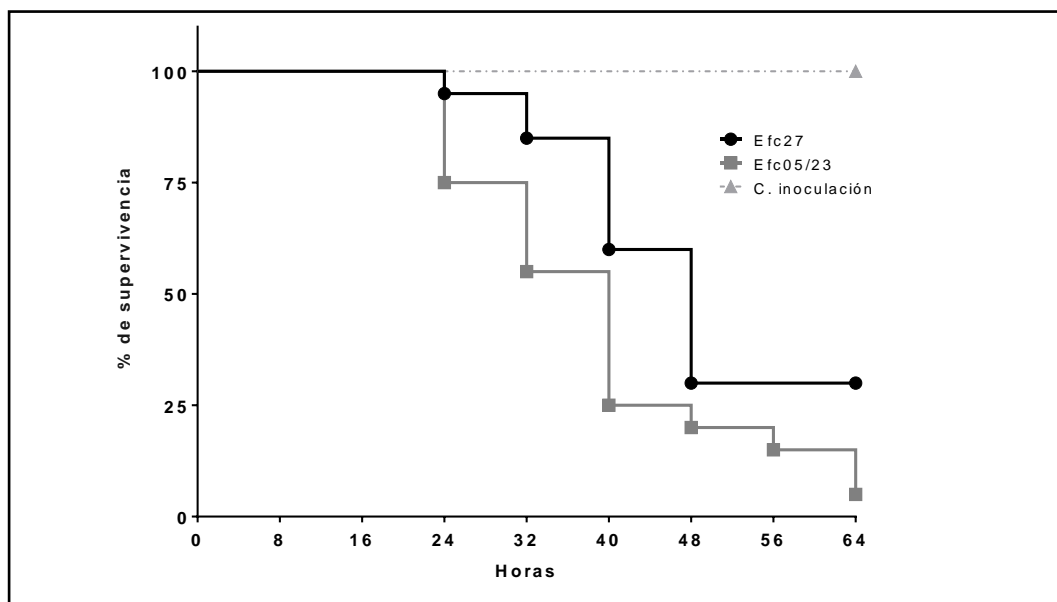


Figura 17. Comparación de la letalidad de los marcadores *gelE*⁺, curva de supervivencia Kaplan-Meier; *E. faecalis* (marino y clínico). Perfil: *gelE*⁺. Existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}} = 0.0138$). Sup._{media}: Efc27 (48 horas) y Efc05/23 (40 horas).

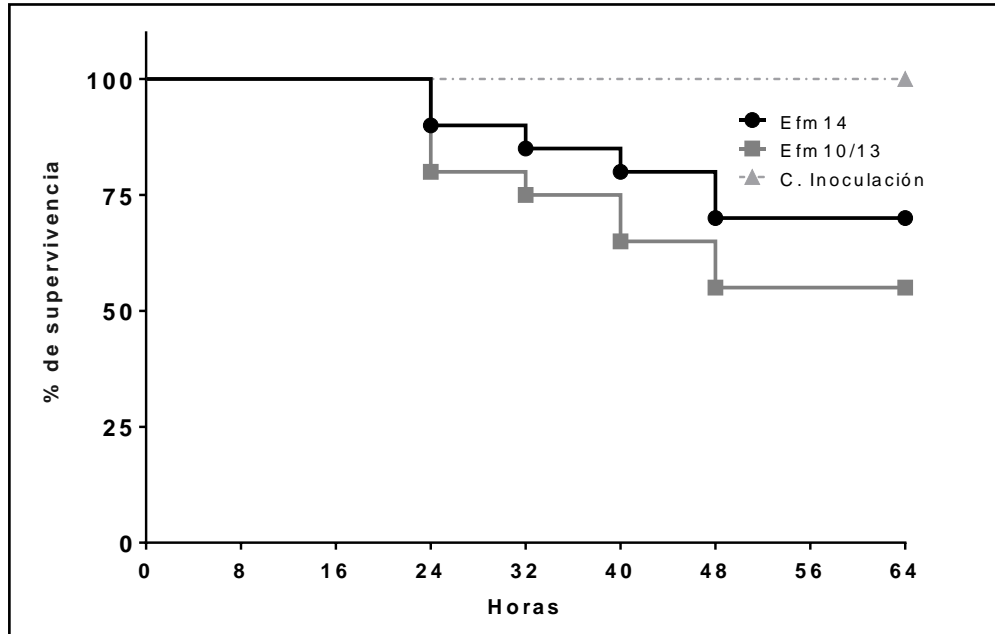


Figura 18. Comparación de la letalidad de *E. faecium*; perfil $esp^+/gelE^+$, curva de supervivencia Kaplan-Meier; *E. faecium* (marino y clínico). Perfil: $esp^+/gelE^+$. No existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{valor}=0.3113$).

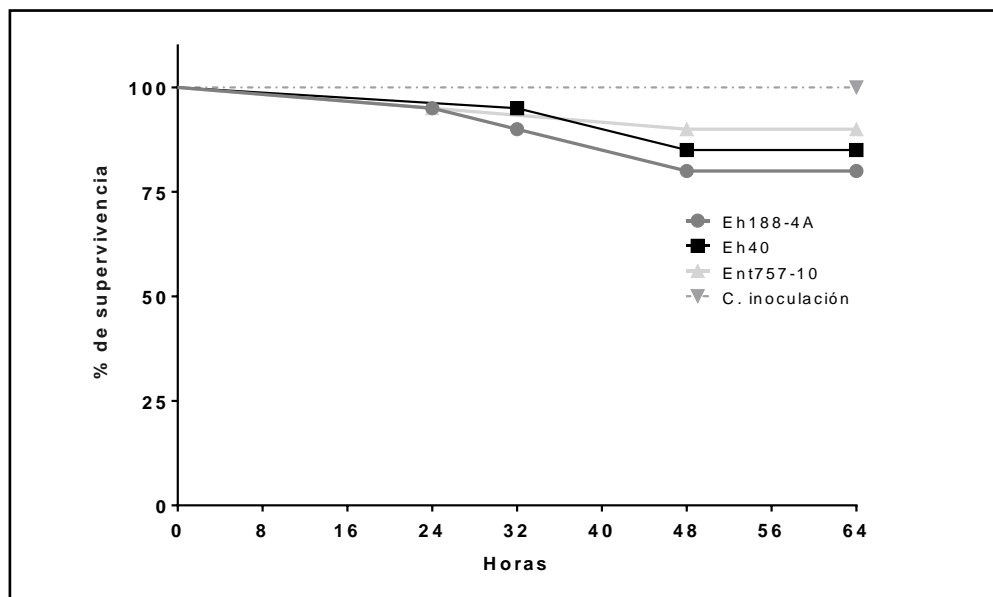


Figura 19. Enterococos de baja virulencia (*E. hirae*; *E. avium*), curva de supervivencia Kaplan-Meier; enterococos clínicos: *E. hirae* (cepa Eh188-4A), *E. avium* (cepa Ent757-10) y *E. hirae* de origen marino (Cepa Eh40). Ninguna cepa supera el 25% de mortalidad. No existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{valor}=0.6793$).

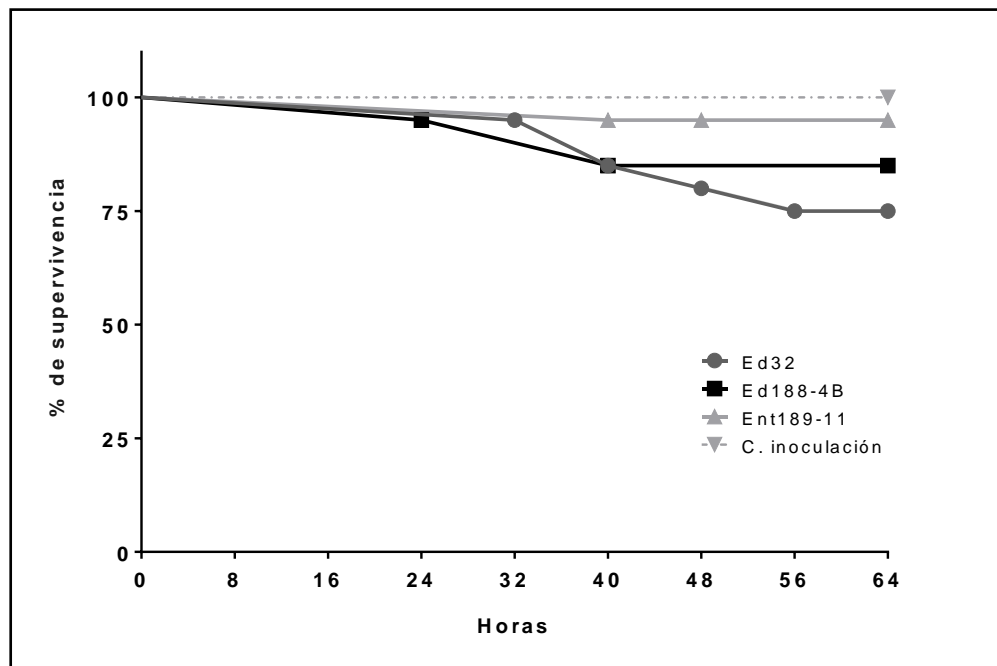


Figura 20. Enterococos de baja virulencia (*E. durans*; *E. raffinosus*), curva de supervivencia Kaplan-Meier; *E. durans* marino (cepa Ed32), *E. durans* clínico (cepa Ed188-4B) y *E. raffinosus* (cepa Ent189-11). Ninguna cepa supera el 25% de mortalidad. No existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}}=0.2251$).

6. DISCUSIÓN

6.1. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

El ambiente marino alberga una población microbiana muy diversa y en constante cambio, este dinamismo es motivado por múltiples factores bióticos y abióticos, algunos con carácter estacional. En este ambiente tan diverso los enterococos representan un grupo alóctono, con algunas cepas de origen antropogénico; en tanto que bajo un ambiente clínico ocurre una constante selección positiva de cepas con características propias y cada vez más virulentas que evolucionan rápidamente bajo una presión constante por agentes antimicrobianos, en ambos casos su potencial patogénico puede ser determinada por la virulencia de la cepa y su capacidad de resistencia al tratamiento clínico; tomando en cuenta esto se han determinado también los antibiotipos de resistencia antimicrobiana, analizándose las características presentes en ambos grupos.

Reportamos en esta investigación bajos niveles de resistencia antimicrobiana para el grupo de origen marino, en donde la resistencia a estreptomicina parece ser importante, y es más notable aún que el perfil combinado rifampicina/estreptomicina estuvo presente casi siempre, con excepción del grupo *E. faecalis*, en las otras especies de enterococos marinos; esto es contrastable con los hallazgos de Lata *et al.*, (2009) que en aguas de río contaminadas con aguas residuales hallaron resistencia a estreptomicina y gentamicina en casi todos los enterococos muestreados, con una distribución significativa de resistencia a eritromicina y rifampicina en asociación con vancomicina.

Reportamos además resistencia significativa a eritromicina en *E. faecium* (22.2%) y *E. faecalis* (14.3%), mientras que la resistencia a rifampicina estuvo presente en 26.5% de las cepas, con exclusión del grupo *E. faecalis*. Si bien *E. faecium* y *E. faecalis* son, por regla general los enterococos de principal importancia médica, encontramos que el 74% de *E. faecalis* y el 55% de *E. faecium* fueron sensibles a los antibióticos usados, patrón distinto a lo observado por otros autores (Sapkota *et al.*, 2007; Di Cesare *et al.*, 2013) en donde *E. faecalis* y *E. faecium* presentan mayor resistencia; si bien se sostenía que existía una baja resistencia antimicrobiana de enterococos en zonas marinas y aguas recreacionales poco impactadas, cada vez se hace más frecuente la recuperación de cepas multiresistentes y cuyos perfiles son similares a los presentes en aguas residuales.

Contrariamente a lo esperado se reportó multiresistencia en los aislados de *E. hirae* y *E. durans* aun cuando son escasos los episodios infecciosos de importancia médica que involucren a estas especies; se observó además que *E. durans* era resistente a 3 antibióticos (ciprofloxacina, rifampicina y estreptomina) y *E. hirae* a 6 antibióticos (ciprofloxacina, rifampicina, norfloxacina, tetraciclina, eritromicina y estreptomina) con múltiples perfiles de resistencia a 4 y 3 antibióticos, en tanto solo 5 cepas de *E. durans* y *E. hirae* que fueron sensibles a los antibióticos usados. A este respecto Blanch *et al.*, (2003) establecieron que la presencia de *E. hirae* y *E. durans* era muy común en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), con una mayor prevalencia de *E. hirae* sobre *E. durans*, más aún Da Silva *et al.*, (2005) observaron que la presencia predominante de *E. hirae* sobre otras especies en aguas residuales sin tratar y las cepas resistentes no eran eliminadas por las PTAR, favoreciendo la selección positiva de resistencia a ciprofloxacina y otros antibióticos (Vilanova *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2005;) lo cual es concordante con nuestros resultados.

Los mayores niveles de resistencia, hallados en *E. hirae* y *E. durans* pondrían en evidencia casos de resistencia adquirida por transferencia horizontal de genes, y cuyo origen procedería de individuos asintomáticos portadores o en su defecto de aguas residuales de granjas con sistemas de crianza extensiva de ganado porcino o bovino, que se ha reportado también poseer elevados niveles de resistencia antimicrobiana para *E. hirae* (Kuhn *et al.*, 2005).

Sólo se detectaron casos de resistencia intermedia a vancomicina en *E. hirae* (cepas Eh15 y Eh23) y *E. durans* (cepa Ed32), mas no en *E. faecalis* ni *E. faecium*, esto es concordante con el hecho de que actualmente el uso de vancomicina está limitado a nivel local. Sin embargo el uso de otros glicopéptidos como la avoparcina, usado como promotor del crecimiento de las aves y cuyo uso en el país se desconoce, podría suponer un riesgo potencial por contaminación con aguas residuales provenientes de granjas que ha ocasionado casos de resistencia cruzada en ciertas regiones de Europa, contribuyendo así a la selección positiva de cepas resistentes y la posterior infección al hombre (Silva *et al.*, 2006; Agers *et al.*, 2008;).

Considerando que actualmente la selección de la terapia antibiótica contra las infecciones enterocócicas no es sencilla por la múltiple resistencia intrínseca y adquirida que presentan se han incluido varios de los antibióticos usados actualmente en la profilaxis clínica. Reportamos en el grupo clínico perfiles múltiples de resistencia distintos al grupo marino y que dependerían de la especie involucrada y el origen propio de la infección.

Entre las diferencias propias de resistencia por especie se observaron diferencias marcadas entre *E. faecalis* y *E. faecium*. En *E. faecalis* la resistencia a tetraciclina y ciprofloxacina fue superior al 60% de los casos, mientras que en *E. faecium* se presentaron perfiles con resistencia múltiple a ciprofloxacina, penicilina, estreptomicina y vancomicina que superaron el 70% de los casos. Similares resultados se reportaron en Cuba por Quiñonez *et al.*, (2008) quienes describieron que la resistencia más común presentada en *E. faecalis* era a tetraciclina y eritromicina; mientras que *E. faecium* presentó altos niveles de resistencia a ampicilina, ciprofloxacina, norfloxacina y levofloxacina.

Por otro lado, se reportaron bajos niveles de resistencia a cloranfenicol (9.1% de todo el grupo clínico) sin embargo cuando el origen de la infección provenía de sangre estuvo presente en el 66.7% de los casos (ambas cepas *E. faecalis*). En las infecciones cuyo origen proviene de catéter y abscesos en todos los casos las cepas aisladas (todas *E. faecium* EVR) presentaron perfiles de resistencia a 5 antibióticos (CIP/EM/P/S/VAN), mientras se observó que en el grupo de enterococos aislados de líquidos corporales se reportaron todos los casos de resistencia posibles con 50% de cepas resistentes a vancomicina. Estas observaciones son relevantes, tomando en cuenta que en la actualidad la terapia antibiótica de infecciones por abscesos o catéter consisten en un tratamiento combinado de ampicilina (o en su defecto vancomicina) con gentamicina o estreptomicina (Gonzales, 2010), por lo que el tratamiento en breve podría no ser del todo efectivo.

Los aislados de *E. faecium* en esta investigación presentaron multirresistencia con perfiles de 5 a 7 antibióticos, en éstos siempre se observó la resistencia a vancomicina, el cual representó el 72.2%. Para los enterococos EVR los elevados niveles de resistencia a vancomicina están codificados principalmente por los genes *vanA* y *vanB* portados en elementos genéticos móviles que tales como los

transposones ligados al *Tn1546* hasta mega plásmidos del tipo *pHyl_{Efm}* con una contrasferencia de genes de resistencia y virulencia (Guardabassi y Dalsgaard, 2004; Arias *et al.*, 2009) por lo que a nivel local la cotransferencia de resistencia y virulencia en *E. faecium* podría estar ocurriendo principalmente en cepas EVR. Contradictoriamente con lo observado en el grupo marino las cepas clínicas de *E. hirae*, *E. durans*, *E. raffinosus* y *E. avium* tienen una baja frecuencia de aislamiento y resistencia antibiótica y en los escasos episodios infecciosos por esos enterococos que se reportaron también se observó baja resistencia antimicrobiana (Stepanovic *et al.*, 2004).

6.2. DETERMINANTES DE VIRULENCIA

La resistencia antimicrobiana por sí sola no puede explicar la virulencia enterocócica, es crucial además la expresión otros factores asociados con la adhesión, translocación y evasión de la respuesta inmune para desarrollar un cuadro patológico (Franz *et al.*, 2001). En esta investigación determinamos la frecuencia de los marcadores de virulencia: *gelE*, *esp*, *hyl* y *cylA*; y el fenotipo a los cuales se ha asociado la expresión de estos genes. Determinamos una baja frecuencia de estos marcadores en el grupo marino, con ausencia de los genes *hyl* y *cylA*; el primero asociado frecuentemente a *E. faecium* EVR, y el segundo que codifica el activador de la toxina betahemolítica enterocócica. Ante una baja prevalencia de enterococos EVR en aguas superficiales y marinas a nivel local parece justificar la ausencia del marcador *hyl* dentro del grupo marino, aunque esta situación podría ser solo temporal y cambiar rápidamente en los próximos años.

Dentro del grupo clínico observamos la presencia del marcador *hyl* sólo en *E. faecium* con una prevalencia del 23.1% de cepas EVR aisladas a partir de muestras de catéter y orina. Recientemente se ha discutido su carácter de hialuronidasa al no detectarse *in vitro* su actividad enzimática, y se la ha reconocido por análisis *in silico*

como una putativa glicosil-hidrolasa que facilitaría la colonización intestinal en el hospedero (Panesso *et al.*, 2011). Además se ha reconocido recientemente que algunos *E. faecium* clínicos aislados en la región andina (lo que incluye Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú) están vinculados con *E. faecium* del complejo clonal 17 (CC17), un genogrupo relacionado por secuencias tipo (ST) basado en el ST17, ampliamente distribuidos en los Estados Unidos y gran parte de Europa, que han ocasionado serios problemas de salud pública (Panesso *et al.*, 2010). Actualmente es muy escasa la información que se conoce sobre la epidemiología molecular a nivel local de *E. faecium* EVR, esto a pesar de lo evidente de su presencia en nuestro país (Flores., 2010).

Al margen de la patogenicidad a la cual estaría asociada la expresión de *hyl*, la presencia de este marcador que ha sido reportado en el aislamiento de casi todos los mega plásmidos (mayores a 150 Kb) presentes en *E. faecium* (sean estos asociados o no al CC17), podría ser usado como un marcador eficaz para el reconocimiento de *E. faecium* emergentes a nivel local con gran capacidad de resistencia antimicrobiana y virulencia, que estarían asociados a los recientes episodios infecciosos nosocomiales de distribución global (Freitas *et al.*, 2010).

Adicionalmente hallamos en todos los casos donde se detectó *hyl* la presencia del marcador *esp*; similar observación fue reportado por Vankerckhoven *et al.*, (2004) donde la asociación binaria de estos marcadores estaba presente en el 76% de las cepas *hyl*-positivas y que además eran resistentes a ampicilina; de igual forma Rice *et al.*, (2003) observaron esta misma asociación en más del 90% de las cepas *hyl*-positivas, estas evidencias confirman que ambos determinantes viajan en el mismo elemento genómico, que en algunos casos puede involucrar islas de patogenicidad (Oancea *et al.*, 2004).

Por otra parte la hemolisina es seleccionada positivamente en ambientes hospitalarios lo cual la hace un importante factor de virulencia para algunos tipos de infecciones (Cox *et al.*, 2005). Si bien no se detectaron en esta investigación cepas marinas betahemolíticas se observó una actividad hemolítica parcial sobre sangre humana para algunas cepas. Se sabe que los enterococos poseen a su vez otros tipos de bacteriocinas no patogénicas útiles en el control del nicho ecológico (Nes *et al.*, 2007), esta capacidad de producir una variedad de bacteriocinas podría ser la razón de las hemólisis parciales (*alpha* hemólisis) que se observaron en el 55.6% y el 44.4% de los *E. faecium* y *E. durans* marinos respectivamente; mientras que en las cepas de *E. faecalis* marinos no se observaron estas características, similares resultados también se observaron en el grupo de *E. faecalis* clínicos.

El sistema genético del operón *cyl*, el cual codifica la hemolisina, es muy complejo e involucra la participación de 8 genes, de los cuales el gen del activador de esta toxina (*cylA*) ha sido frecuentemente usado como marcador en la identificación de este operón (Cox *et al.*, 2005). Incluso se espera que en un futuro cercano se diseñarán medidas terapéuticas basadas en la administración de proteasas, dirigidas precisamente a neutralizar su trascendental participación en muchas infecciones enterocócicas, por lo que la presencia de *cylA* en el ambiente marino debería ser evaluada periódicamente (Garza *et al.*, 2002)

A diferencia del grupo marino, se detectó la presencia de *cylA* en 3 *E. faecalis* (27.3% de la especie) aisladas de orina y LCR, mientras que 2 cepas de *E. faecium* (11.1% de la especie) portaban el marcador, aunque una cepa aislada precisamente de sangre no expresó el fenotipo betahemolítico. La pérdida de la actividad hemolisina ha sido observada por otros investigadores y los resultados reportados sugieren que el silenciamiento de estos genes, que presentan *in vitro* una actividad negativa, bajo ciertos factores ambientales hallados en los sitios de infección pueden revertir y

presentar de nuevo actividad, debido a que poseen un sistema muy versátil de control de la expresión por *quorum sensing*, aún no del todo comprendido (Eaton y Gaston, 2001).

Reportamos además una baja prevalencia de enterococos betahemolíticos indistintamente en infecciones invasivas como no invasivas, a diferencia de Creti *et al.*, (2004) quienes hallaron una mayor prevalencia de *cyIA* entre las cepas no invasivas (62.5%) y comensales que en las cepas invasivas (50%) donde la actividad hemolítica estaba presente en el 64.7% de las cepas *cyIA*-positivas; por otro lado Huycke y Gilmore (1995) hallaron una mayor frecuencia de *cyIA* en bacteriemias que en los casos de endocarditis o en heces de individuos sanos. A este respecto la patogenicidad de la hemolisina no está en discusión, más su presencia en algunos tipos de infección no es todavía del todo clara.

El carácter betahemolítico de la hemolisina sobre sangre humana es una característica exclusiva, se confirmó esta actividad mediante la siembra realizada en agar sangre de carnero de las cepas positivas, bajo las mismas condiciones no se presentó beta hemolisis, se sabe ahora que el alto contenido de fosfatidilcolina presente en la membrana externa de eritrocitos humanos, conejos y caballos (pero no en eritrocitos de carnero u ovejas) permite un alto grado de susceptibilidad para la actividad hemolítica mediada por hemolisina enterocócica (Coburn y Gilmore, 2003).

Por otra parte, un factor crucial para colonización y persistencia de muchas infecciones enterocócicas están relacionadas con la capacidad de formar biopelículas; Bajo condiciones críticas la biopelícula madura puede tolerar una mayor concentración de antibiótico en la orden de 10 a 1000 veces superior a la necesaria para matarla en su estado planctónico, a su vez le confiere resistencia a la fagocitosis, lo cual dificulta en extremo su erradicación del hospedero (Lewis, 2001) a su vez se

han reportado casos donde la formación de biopelículas incrementa la frecuencia de transferencia de plásmidos en *E. faecalis* (Kajiura *et al.*, 2006).

Ciertos factores externos involucrados en el metabolismo de muchas bacterias están relacionados directamente con el desarrollo de un fenotipo fuertemente productor; entre éstos se encuentran la disponibilidad de hierro y CO₂, glucosa, suero, osmolaridad, pH y temperatura; el metabolismo de los carbohidratos regula la formación de biopelícula entre varios Gram positivos, incluyendo *E. faecalis* (Pillai *et al.*, 2004). Aquí reportamos que bajo una concentración relativamente alta de glucosa se indujo a una mayor producción de biopelículas en las cepas, tomando como referencia un medio de cultivo (TSB) y 3 tipos de concentraciones de azúcar (0, 0.5 y 0.75%) se obtuvieron los mejores resultados con 0.75% de glucosa.

El uso adicional del carbohidrato permite obtener resultados *in vitro* que expresen la mayor capacidad de la cepa, el uso de glucosa como inductor puede darnos una idea más realista de la capacidad potencial que la cepa alcanzaría *in vivo*. Un estudio realizado por Baldassarri *et al.*, (2001) revelaron que al emplear TSB suplementada con 1% de glucosa se elevaba la producción de biopelículas en *E. faecalis* comparado con el medio TSB sin suplementar; mientras que Tendolkar *et al.*, (2004) demostraron que la presencia de altas concentraciones de glucosa mejoraba significativamente el biovolumen y el espesor de la biopelícula en *E. faecalis* esp positivas sobre las cepas esp negativas

Hallamos que los niveles de producción de biopelículas son considerablemente altos en el grupo marino con un mayor porcentaje del fenotipo fuerte en *E. faecalis*. Similares características apreciadas también en *E. hirae* y *E. durans*, que en su mayoría resultaron moderados a fuertemente productores; y por último en *E. faecium* contrariamente se observaron los menores niveles de producción

de biopelícula, en donde el 55.6% presentó un fenotipo débil. Lo observado entonces, con excepción de *E. faecium*, sugiere que la producción de biopelículas en un ambiente poco favorable como el marino, es crucial para la supervivencia enterocócica.

Sabemos que la viabilidad microbiana, bajo las condiciones anteriormente descritas, decae rápidamente y el ingreso a estados de BVNC tiene como condición previa la adhesión a superficies bióticas como abióticas. Anteriormente Signoretto *et al.*, (2004) identificaron mediante uso de anticuerpos marcados la presencia de *E. faecalis* adheridos al exoesqueleto quitinoso de copépodos presentes en agua marinas y cuya presencia no había sido detectada por los métodos convencionales, similares características han sido observadas también por Maugeri *et al.*, (2004) quienes hallaron que la supervivencia de enterococos en ambientes marinos ocurre principalmente por la adhesión al plancton durante el periodo de invierno.

El patrón de biopelículas observado en el grupo clínico difiere al marino; en este grupo todas las cepas de *E. faecalis*, independientemente al origen de la infección, desarrollaron un fenotipo fuertemente productor de biopelícula; mientras que todas las demás cepas, con excepción de una *E. faecium* aislada de orina, en su mayoría desarrollaron fenotipos moderados a débiles. Toledo-Arana *et al.*, (2001) demostraron que la absorbancia de las células teñidas en placas de poliestireno tenían relación con la adherencia inicial y el tipo de biopelícula que desarrollará *in vivo* la cepa.

En infecciones urinarias sólo los *E. faecalis* presentaron un fuerte fenotipo productor de biopelículas, mientras que los *E. faecium* del mismo origen fueron en su mayoría débiles productores; resultados similares se obtuvieron en sangre y líquidos corporales. Sólo una cepa de *E. faecium* aislada de orina tuvo un fenotipo fuerte, esta

excepción estaría relacionada con la presencia de actividad gelatinasa en la cepa, ya que la actividad gelatinasa ha sido previamente vinculada con la expresión de mayores niveles de biopelícula (Kristich *et al.*, 2004).

Contradictoriamente las muestras de catéter, de las cuales sólo se aislaron *E. faecium* EVR, todas fueron débiles a moderadas productoras de biopelículas aun portando el gen *esp*. Se sabe que los enterococos colonizan catéteres, marcapasos, válvulas cardíacas y otras piezas ortopédicas, ocasionando directa e indirectamente endocarditis, otitis media crónica y en algunos casos fibrosis quística (Costerton *et al.*, 1999) y casi siempre acompañado de una expresión del fenotipo fuertemente productor.

Los casos de enterococos EVR aquí reportados corresponderían a episodios invasivos de catéter ocasionados por infecciones mixtas. Al respecto Stickler (2008) mencionó que los enterococos se hallan asociados comúnmente en infecciones mixtas de catéter junto con *P. aeruginosa*, *E. coli* y *P. mirabilis* conocidas por ser fuertemente productores de biopelículas; en tanto que los episodios donde enterococos son los únicos responsables de la invasión son escasos. Bajo este contexto entonces es posible que *in vivo* estos enterococos expresaran un fenotipo fuerte o simplemente se asocien con otros grupos de bacterias quienes les facilitarían el proceso de colonización.

Ahora se sabe que una fuerte producción de biopelícula tiene un origen multigénico, en *E. faecalis* se han reportado la influencia del producto del gen *esp* por Toledo-Arana *et al.* (2001), la gelatinasa enterocócica (Hancock & Perego, 2004; Kristich *et al.*, 2004) y la expresión de otros genes como antígeno *Epa* (*enterococcal polysaccharide antigen*), la autolisina *Atn* (Mohamed *et al.*, 2004), la proteína *Bop* (*Biofilm on plastic surface*) (Hufnagel *et al.*, 2004), y los antígenos de secreción *SalA* y

SalB (Mohamed *et al.*, 2006). Al respecto se ha buscado relacionar en esta investigación la presencia de *esp* y *gelE* con una expresión fuerte de biopelículas en las cepas de estudio.

Bajo el análisis descriptivo de los datos se observó que la presencia de *esp* y la expresión de *gelE* están relacionados con la fuerte producción de biopelículas principalmente en *E. faecalis* y con una mayor correspondencia en cepas de origen clínico sobre los de origen marino, si bien algunos *E. faecalis* marinos portaban el marcador *gelE*, era notoria la ausencia de actividad gelatinasa dentro de este grupo. Asumimos como probable que la falta de actividad repercute sobre una mayor producción de biopelículas, en tanto la presencia de *esp* en los casos observados elevó los niveles de producción de biopelículas. En *E. faecium* la presencia de *esp* no se relacionó con mayores niveles de producción, mientras que las cepas clínicas de *E. faecium* portadoras de *gelE* favorecieron ligeramente la formación de moderados fenotipos de biopelículas. Caso distinto al observado en *E. faecium* marino donde no se determinó correlación entre la presencia de los marcadores y un determinado tipo de biopelícula.

Si bien existen otros determinantes genéticos para la expresión de biopelículas, cuya presencia en las cepas de estudio no se ha determinado, *esp* es un buen marcador de virulencia en enterococos. Se ha reconocido que la presencia de *esp* incrementa la capacidad *in vitro* para adquirir por conjugación los genes *vanA*, relacionados con altos niveles de resistencia a vancomicina (Lund *et al.*, 2006), además de ser un elemento portado por islas de patogenicidad relacionados con *E. faecium* CC17, más aún el gen *esp* de *E. faecium* tiene un 90% de homología con *esp* de *E. faecalis*, pero a diferencia de ésta su función no es aún del todo comprendida (Heikens *et al.*, 2007)

Se sabe además que la gelatinasa enterocócica se cotranscribe con una serinproteasa (*sprE*) y ambas son reguladas por un sistema de genes denominados sistema *fsrABCD* (Quin *et al.*, 2000), de modo que tras la pérdida de algunos de estos elementos la producción de biopelículas puede considerablemente. Así por ejemplo Mohamed *et al.*, (2003, 2004) mostraron una reducción del 32% en la producción de biopelículas en 3 tipos de mutantes deficientes de *fsrA*, *FsrB* y *fsrC* mientras que Hancock y Perego (2004) restauraron la formación de biopelículas por complementación de esos genes. De tal manera que la pérdida de estos genes reguladores podría ser la razón aparente del silenciamiento en la expresión de un fenotipo determinado de biopelícula en las cepas marinas.

El papel de la gelatinasa enterocócica en infecciones es ampliamente conocida y su rol en la virulencia se ha estudiado en diversos modelos animales (Sifri *et al.*, 2002; Mohamed y Murray, 2006) recientemente se ha reconocido su papel en la evasión del sistema inmune del insecto *Galleria mellonella* (Park *et al.*, 2007). La gelatinasa, codificada por *gelE*, posee una amplia gama de sustratos que incluyen la cadena beta de la insulina, hemoglobina, fibrinógeno, fibronectina, colágeno, gelatina, caseína y laminina (Gaspar *et al.*, 2009).

En el grupo marino se detectó sólo una cepa con escasa actividad gelatinasa relativa, aun cuando el marcador *gelE* estuvo presente en 3 cepas de *E. faecalis* (42.9%); 2 cepas de *E. faecium* (22.2%) y 2 *E. durans* (22.2%), mientras que en *E. hirae* no se detectó la presencia de este marcador. La amplia distribución de *gelE* ha sido reportado frecuentemente en aislados ambientales, si bien su expresión casi siempre se encuentra silenciada (Franz *et al.*, 2001; Archimbaud *et al.*, 2002). En la India Lata *et al.*, (2009) reportaron la presencia de *gelE* en enterococos del río Ganges principalmente en *E. faecalis*, seguido por *E. faecium* y *E. durans* y, concordante a nuestros resultados, una baja la prevalencia de este marcador en *E. hirae*.

La no expresión de *gelE* y la baja actividad gelatinasa ha sido descrita por Mohamed y Murray (2005) quienes observaron que pueden existir bajos niveles de actividad gelatinasa en mutantes que carecen de *fsr* debido a la expresión basal del promotor de *gelE* y se ha demostrado que aún en el caso de la transcripción total del operón es probable no detectar actividad enzimática, situación que establece la posible existencia de un control postranscripcional (Lopes *et al.*, 2006). Si a esto se suma la participación de factores abióticos en el ambiente marino, tales como la radiación solar, pueden desencadenar la pérdida de la actividad gelatinasa. Muchos genes no son expresados temporalmente y podrían luego sufrir procesos de reversión durante un ciclo infectivo, bajo la influencia de otros microorganismos comensales y condiciones más favorables en el tracto gastrointestinal. Estas observaciones sugieren que el conjunto de genes que involucrarían la expresión de *gelE*⁺ y su regulación estarían ampliamente distribuidos dentro de los enterococos.

A nivel clínico la presencia de *gelE*⁺ era alta, superior en comparación al grupo marino, esta característica se observó principalmente en *E. faecalis* sobre *E. faecium*. Descriptivamente se determinó relación entre la presencia de *gelE* y el origen de infección por *E. faecalis* en muestras de sangre, orina y líquidos corporales, en donde casi todas las cepas *gelE*⁺ mostraron actividad gelatinasa. Mientras que la relación en *E. faecium* entre *gelE*⁺ y su expresión era menor, pocas cepas demostraron actividad gelatinasa positiva. Algunas investigaciones, concordante a nuestros resultados sugieren también alta prevalencia de *E. faecalis* con actividad gelatinasa en sangre, infecciones piogénicas y orina (Arularasi y Prabakaran, 2011), la característica propia de la gelatinasa en *E. faecalis* le permite persistir en su hospedero, ya sea en el tracto urinario la capacidad de adherencia ante el flujo constante de orina; y a la evasión de la respuesta del sistema inmune en sangre, al hidrolizar ciertos factores importantes involucrados en el desencadenamiento del sistema del complemento.

No se hallaron en esta investigación diferencias significativas entre la actividad gelatinasa relativa de las cepas aisladas en sangre, líquidos corporales u orina, tan sólo una cepa *E. faecalis* reportada con una actividad superior (4.71 R/r) podría ser catalogado como resultado atípico, debido a la homogeneidad de la actividad entre todas las cepas; varios autores han establecido previamente distintas metodologías para medir la actividad gelatinasa (Del Papa *et al.*, 2007; Pires-Boucas *et al.*, 2010) no hallando diferencias significativas en las medidas de la actividad gelatinasa *in vitro*.

6.3. Ensayos de mortalidad en *G. mellonella*

Discutida con frecuencia, la patogenicidad de *Enterococcus* ha mostrado un patrón evolutivo dinámico con la emergencia periódica de cepas altamente virulentas con capacidad invasiva y toxicidad local (Vebo *et al.*, 2009). Previo a los ensayos de mortalidad en *G. mellonella*, se ha determinado frecuencia y distribución de 4 marcadores de virulencia *cylA*, *esp*, *hyl*, *gelE* y la expresión fenotípica *in vitro* en ambos grupos de experimentación; estos son reconocidos frecuentemente como determinantes activos en la evasión de la respuesta inmune y el desarrollo de diversas patologías (Vankerckhoven *et al.*, 2008; Panesso 2010; Singh *et al.*, 2010); en esta investigación se comparó la mortandad de las cepas del grupo clínico y marino en *G. mellonella* estableciéndose diferencias entre los distintos perfiles de virulencia obtenidos previamente.

El uso de *G. mellonella* como modelo animal ha sido contrastado con buenos resultados con procesos propios en una infección humana por otros patógenos (Jander *et al.*, 2000). Si bien la inmunidad adaptativa es única dentro de los vertebrados, la respuesta innata tiene una participación activa en una infección

bacteriana, el cual ha sido altamente conservado entre vertebrados e invertebrados. Así en *G. mellonella* se presenta una respuesta inmune celular y humoral (Vilmos y Kurucz, 1998). Ocasionalmente se han reportado casos clínicos de infecciones humanas por enterococos distintos a *E. faecalis* y *E. faecium* que involucraron principalmente a *E. durans* y *E. hirae*, considerándose por ello a este grupo enterococos de baja virulencia. Estudios previos de la virulencia de estos enterococos son escasos, más aún en cepas ambientales; en esta investigación seleccionamos 4 cepas marinas de este grupo: 2 de *E. durans* y 2 de *E. hirae* y las comparamos con 4 cepas clínicas (*E. durans*, *E. hirae*, *E. raffinosus* y *E. avium*). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la mortandad de ambos grupos y en ningún caso la mortandad superó el 25% en *G. mellonella*.

Respecto a la virulencia *E. durans* y *E. faecium* Gaspar *et al.*, (2009) hallaron que estas especies aisladas de productos lácteos eran relativamente de baja virulencia, con una mortandad hasta del 3% de las larvas de *G. mellonella*, mientras que el rango de mortalidad en *E. faecalis* de origen clínico y lácteos osciló entre el 60 al 98%. los resultados obtenidos muestran una mortandad superior, tomando en cuenta que se emplearon dosis similares del patógeno y más aún cuando existía, como único marcador, una baja prevalencia de *gelE*; ante la ausencia de estudios previos en cepas marinas, evaluamos por primera vez a nivel local la virulencia relacionada con las especies de enterococos mencionadas anteriormente.

Comparativamente, la presencia de *esp* en *E. faecalis* estuvo acompañada de una mortalidad inicial más temprana en el grupo clínico como en el marino, característica no observada en *esp* de *E. faecium*. La baja virulencia de las cepas marinas ha sido corroborada en *G. mellonella* con una mortalidad que no superó el 40% cuando *esp* está presente en *E. faecalis* y el 30% en *E. faecium*. La proteína de superficie enterocócica madura está anclada en la pared celular, aunque no posee

capacidad hidrolítica o toxigénica, su expresión le otorga capacidades superiores de adherencia y evasión de la respuesta del sistema inmune del hospedero (Toledo-Arana, 2001); *a priori* se observa que *esp* incrementa la capacidad de colonización en ambos grupos y otros autores han relacionado su presencia con otros determinantes de virulencia codificados en los mismos elementos genéticos, considerando a *esp* como marcador recurrente en cepas epidémicas (Oancea *et al.*, 2004).

La virulencia asociada a *esp* ha sido estudiada en varios modelos, Shankar *et al.*, (2001) usando el modelo CBA/J del ratón demostró que la presencia de esta proteína incrementaba la capacidad de adherencia a las células epiteliales del tracto urinario, pero no en epitelio renal frente a una mutante isogénica *esp*-negativa, aunque sin cambios histopatológicos asociados. Por otro lado Pultz *et al.*, (2005) usando otro modelo de ratón con inoculación previa con clindamicina aseveraron que *esp* no facilitaba la colonización intestinal o translocación de *E. faecalis* a los nódulos linfales, sin embargo no se han reportado casos donde se ha usado *G. mellonella* para evaluar la virulencia de *esp*. Aunque en esta investigación no se evidenció una alta mortandad en este modelo, se sostiene en esta investigación que si bien no hay otras funciones adicionales asociadas a *esp*, al estar relacionado con otros marcadores de virulencia principalmente en *E. faecalis*, su identificación serviría como un marcador importante de la virulencia que podría hallarse en las cepas a nivel local.

Asociado a *esp* se ha encontrado en este estudio otro elemento genético: *hyl*, una posible glicosil-hidrolasa que ha sido descrita anteriormente como una hialuronidasa y sólo presente en *E. faecium*, ambos elementos genéticos estarían codificados en un megaplásmido (pHyl_{fm}) como fue reportado con frecuencia (Rice *et al.*, 2003); la presencia de *hyl* indica la presencia de pHyl_{fm} el cual incrementa las propiedades patogénicas en *E. faecium* disminuyendo considerablemente la

supervivencia cuando es inoculado en el modelo de peritonitis murino (Arias *et al.*, 2009).

En esta investigación la asociación *hyl+/esp+* fue recurrente y sobre la mortandad en *G. mellonella* la presencia de *esp* no aceleró el proceso infectivo a diferencia de lo observado en *E. faecalis*, sin embargo se observó una supervivencia media de 48 a 56 horas y una mortandad cercana al 60% en las 3 cepas bajo el perfil *hyl+/esp+*; no se ha detectado actividad hialuronidasa *in vivo* y tampoco se había descrito anteriormente el efecto de *hyl* en *G. mellonella*, por lo que tampoco es posible deducir cual es el mecanismo patogénico empleado. Recientemente Panesso *et al.*, (2011) determinaron que los 4 genes presentes en la region *hyl* (incluido el gen *hyl_{fm}*) presentes en el plásmido pHyl_{fm} no mediaban el incremento de la virulencia en el modelo de peritonitis murino, por lo que aún permanece la incógnita de cual es el mecanismo de virulencia en el plásmido pHyl_{fm}. Al margen de estas observaciones, y debido a la diferencias entre los perfiles de virulencia por especie, *hyl* sería un importante marcador de virulencia en el estudio epidemiológico propio de *E. faecium*.

El tercer determinante de virulencia evaluado en *G. mellonella* fue la hemolisina, una toxina citolítica codificado por el operón *cyl*, cuya presencia anteriormente se ha reportado en plásmidos del tipo pAD-1, y en menor grado como parte del cromosoma bacteriano e islas de patogenicidad (Ike y Clewell, 1992; Manson *et al.*, 2010). Se establecieron en este estudio diferencias significativas entre los modelos de supervivencia Kaplan-Meier y la supervivencia media entre *E. faecium* y *E. faecalis* citolíticos de origen clínico; además de hallarse diferencias entre cepas portadoras de *cylA* sin expresión del fenotipo y otras hemolíticas (*cylA+*) en *E. faecium*, en donde la mortalidad fue del 60 y 75% respectivamente. Se describe en esta investigación que la hemolisina es un importante factor de virulencia en

enterococos, curiosamente aún cuando no se observó *in vitro* expresión del fenotipo hemolítico, las cepas *cylA* positivas alcanzaron una mortalidad considerablemente alta.

Se ha descrito anteriormente que el plásmido pAD-1, el cual frecuentemente está presente en enterococos de origen clínico, porta el operón completo de la hemolisina y, a su vez, la sustancia de agregación (*asa*) el cual es otro factor de virulencia importante; *asa* es inducida por feromonas y está relacionada con la adhesión a las proteínas de la matriz extracelular del hospedero, incrementando la hidrofobicidad de estas superficies (Kayaoglu y Orstavik, 2004); en esta investigación no se ha establecido la frecuencia de *asa* en las cepas, por lo que su presencia contribuiría a la alta mortalidad aun en cepas que no presentan *in vitro* la actividad hemolítica.

Al respecto diversos modelos se han utilizado para estudiar la participación de *cylA* y *asa* en la virulencia enterocócica. Ike *et al.*, (1984) fueron los primeros en describir la correlación dependiente entre el plásmido pAD-1 que codifica la hemolisina, y la toxicidad en peritonitis murino con respecto a cepas isogénicas de *E. faecalis*, sin embargo los efectos solo eran diferenciables para dosis superiores de 10^7 UFC/ratón; mientras que Chow *et al.* (1993), usando el modelo de endocarditis en ratones, evaluaron la virulencia conferida por el plásmido pAD-1 (*cyl*⁺/*asa*⁺) y sus respectivas mutantes isogénicas hallaron que todos los aislados producían endocarditis, sin embargo solo la combinación de hemolisina y la sustancia de agregación incrementaban la mortalidad en el modelo de endocarditis en ratón. Contrariamente Garsin *et al.*, (2001) en base a su investigación sugiere que el operón *cyl* es un importante factor de virulencia que afecta la mortandad del nematodo *C. elegans* independientemente de la presencia de la sustancia de agregación (*asa*), esto considerando que este modelo animal carece de una respuesta inmune celular.

A diferencia de lo antes mencionado *G. mellonella* si presenta una respuesta inmune humoral y celular, con varios mecanismos de respuesta análogos a los presentes en mamíferos. Tomando en cuenta esto la mortandad se incremento considerablemente en *E. faecalis* y *E. faecium* a las 24 y 32 horas post infección alcanzado una mortandad completa para *E. faecalis* a las 48 horas, mientras que en *E. faecium* la supervivencia promedio fue cercana al 30% de larvas inoculadas. Bajo el modelo de endoftalmitis de conejo Jett *et al.*, (1992) examinaron la contribución de la hemolisina con la toxicidad y destrucción del tejido retinal y neural sobre las 24 a 72 horas postinfección. La infección con *E. faecalis* hemolítica resultaba en la pérdida del 99% de la función retinal, sobre la infección de la cepa isogénica no hemolítica que presentó una pérdida del 74%. Aunque no se ha descrito como participa la hemolisina en la mortalidad de *G. mellonella* se conoce que en ratones el daño y mortalidad por enterococos citolíticos se debe a mecanismos como: inducción de grandes reacciones inflamatorias; capacidad de cruzar la barrera endotelial rápida y eficiente; menor susceptibilidad a los macrófagos de Kuffer y una masiva necrosis coagulativa ocurrida en hígado y riñones (Gentry-Weeks *et al.*, 2003).

Previamente se han determinado diferencias de la actividad gelatinasa entre el grupo clínico y marino, además de identificarse enterococos marinos *gelE*⁺ sin actividad de la enzima. Los ensayos de mortalidad de *G. mellonella* por *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. hirae* (*gelE*⁺) marinos sin actividad gelatinasa presentaron una baja mortalidad del 15 y el 25%, característica similar a la observada en la mortalidad por enterococos marinos que no presentaron los marcadores. No se hallaron en esta investigación diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia dentro del grupo clínico gelatinasa positiva, observándose una homogeneidad en el inicio de la mortalidad (24 horas) y la supervivencia media (40 horas), aunque curiosamente se observó una menor mortandad en *E. faecium*, particularmente en la cepa Efm12/20 que anteriormente presentó la mayor actividad

gelatinasa entre todas las cepas, lo cual sugiere que una mayor actividad de la enzima no necesariamente estaría relacionado con una mayor virulencia sin embargo aún bajo una expresión basal de la enzima se produciría cierta capacidad virulenta, como lo demostró los resultados entre el grupo marino y clínico que si bien presentaron diferencias tanto en la supervivencia media y la final a las 64 horas, se observó una considerable mortandad.

En el grupo marino la mortandad se describió como escasa durante las primeras 32 horas y abruptamente se incrementó a las 40 horas con un máximo del 70% de mortandad al final del experimento. Al respecto Zeng *et al.*, (2005) estudiando la capacidad de translocación por *E. faecalis* (*gelE*⁺) sobre la monocapa polarizada de las células T84 derivado de carcinoma humano de colon observaron una capacidad de translocación efectiva principalmente en todas las cepas gelatinasa positivas lo cual no se observó en cepas no productoras, esto sugiere que la actividad gelatinasa es una condición importante para una exitosa translocación *in vitro* de *E. faecalis* sobre la membrana de enterocitos T84.

Sobre la respuesta inmune observada en *G. mellonella* y en suero humano Park *et al.*, (2007) demostraron que los efectos de la virulencia de *E. faecalis* (*gelE*⁺), en donde GelE directamente hidrolizaba péptidos antimicrobiano del grupo Cecropin y la proteína del complemento C3a. Esta capacidad potencial de degradar proteínas de hospederos tan distintos es posible debido existe una homología evolutiva entre proteínas propias en la respuesta innata de insectos y otras presentes en vertebrados como el caso de la profenoloxidasa, enzima responsable de los procesos de defensa que involucran melanización en insectos, el cual contiene secuencias similares a la

región tio-éster presente en las proteínas C3 y C4 del sistema de complemento en vertebrados (Vilmos y Kurucz, 1998).

Park *et al.*, (2008) describieron además que GeIE paralizaba el sistema de complemento humano vía dos procesos: primero al presentar una homología funcional a la convertasa soluble C3 que convierte el C3 circulante en C3b el cual es inactivado instantáneamente al reaccionar con el agua y el segundo proceso ocurre cuando GeIE degrada dos fragmentos de la cadena alfa de iC3b y de esta forma es removido de la superficie del patógeno; consecuentemente no ocurre la unión iC3b/CR3 entre el patógeno y los PMN, y de esta forma se anula la muerte del patógeno mediada por PMN. Contrariamente la proteína sprE extracelular, que también se cotranscribe con *geIE* no afecta la respuesta del sistema inmune en *G mellonella* como en suero humano.

Finalmente el perfil de marcadores *cylA⁺/esp⁺/geIE⁺* presente solo en *E. faecalis* clínicos demostró ser la combinación más virulenta con una mortalidad del 100% alcanzada a las 48 horas. En todos los casos la actividad de la gelatinasa implicó una considerable mortandad, aún cuando no se hallaron otros marcadores de virulencia. Se ha observado que la expresión de *geIE* contribuye con la bacteriemia enterocócica, el cual ha sido considerado importante en infecciones poli microbianas, de acuerdo con esto se ha propuesto que los enterococos gelatinasa-positivos tendrían una función crítica en el sinergismo bacteriano y el desarrollo de la enfermedad causada por otros organismos con mayor virulencia (Montravers *et al.*, 1994)

7. CONCLUSIONES

- Existen diferencias entre los perfiles de virulencia y resistencia antimicrobiana del grupo de enterococos clínicos y el marino.
- Los perfiles de multiresistencia antimicrobiana en enterococos clínicos son similares y están determinados por la especie y por el origen de la infección; en tanto que en el grupo marino los perfiles de resistencia son similares en casi todas las especies aisladas.
- Se determinó una baja diversidad de marcadores de virulencia en el grupo marino, principalmente *esp* y *gelE*, y una escasa actividad gelatinasa; en tanto que en el grupo clínico se observó una mayor diversidad, predominante en *E. faecalis* sobre otras especies, y cuyos perfiles se han relacionado principalmente con el origen de la infección.
- La expresión de un fenotipo fuertemente productor de biopelículas en los enterococos marinos está ampliamente distribuida y ha demostrado ser independiente de *esp* y *gelE*.
- La expresión de un fenotipo fuertemente productor de biopelículas en los enterococos clínicos esta principalmente presente en *E. faecalis* sobre otras especies y se ha vinculado a la presencia de *esp* y la expresión de *gelE*.
- La actividad hemolítica y gelatinasa en los enterococos contribuyen a una mayor mortandad en el modelo experimental *G. mellonella*.
- La mortandad ocasionada principalmente por *E. faecalis* del grupo marino en *G. mellonella* es similar a la mortandad observada dentro del grupo clínico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGERS, Yvonne; LESTER, Camila; PORSBO, Lone; *et al.*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. *Journal of. Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; p. 844-845.
2. ARCHIMBAUD, Christine; SHANKAR, Nathan; FORESTIER Christiane, BAGHDAYAN, Arto; GILMORE, Michael S; CHARBONNE, Francoise; JOLY, Bernard. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Research Microbiol.* 2002, vol. 153, p. 75–80.
3. ARIAS, Cesar; PANESSO, Diana; SINGH, Kavindra; RICE Louis; MURRAY, Barbara. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hlyEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009, vol. 53, n°10, p.4240–4246.
4. ARULARASI, Aberna; PRABAKARAN, Kyuth. Evaluation for the association of virulence determinants among *E. faecalis* with its clinical outcome. *International Journal of biological & medical research*. 2011. Vol. 2 n°.2, p.523–527.
5. BLANCH, Anicet; CAPLIN JL, IVERSEN A, KÜHN I, MANERO A, TAYLOR HD, VILANOVA X. D. Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of applied microbiology*. 2003 vol. 94 n°. 6, p. 994–1002.

6. BALDASSARRI, Lucilla; CECCHINI, Roberto; BERTUCCINI, Lucia; AMMENDOLIA, Maria; ARCIOLA, Carla; MONTANARO, Lucio; DI ROSA, Roberta; GHERARDI, Giovanni. *Enterococcus spp.* produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Medical Microbiology and Immunology*. 2001. Vol.190, p. 113–120.

7. BEN OMAR, Nabil; CASTRO, Araceli; LUCAS, Rosario; ABRIQUEL, Hikmate; YOUSIF, Nuha; CHRALES, Franz; HOLZAPFEL, Wilhelm; PEREZ-PULIDO, Rubén; MARTINEZ-CANAMERO, Magdalena; GALVEZ, Antonio. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*. 2004. Vol. 27, p.118–130.

8. BEARMAN, Gonzalo; WENZEL, Richard. Bacteremias: a leading cause of death. *Archives Meical. Research*. 2005. Vol. 36, p. 646-659.

9. BORN CHIRICHES, Claudia Oancea. “Enterococcal surface protein (Esp) - Epidemiology and transfer between enterococcal strains”. Asesor: Wolfgang Witte. Thesis PhD. Martin-Luther Universitat. Rumania. 2005.

10. CAMPOS, Carmen; RODRIGUEZ, Óscar; CALO-MATA, Pilar; PRADO, Marta; BARROS-VELÁZQUEZ, Jorge. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*. 2006. Vol 39, p. 356–364.

11. CLEWELL, Don; FRANCIA, Victoria; FLANNAGAN, Susan; FLORENCE, An. Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid*. 2002. Vol. 48, p. 193–201.

12. CHOW, Joseph; THAL, Lee; PERRI, Mary; Vazquez, José; DONABEDIAN, Susan; CLEWELL, Don; ZERVOS, Marcus. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993. vol. 37, n° 11, p 2474–2477.
13. COBURN, Phillip; GILMORE, Michael. The *Enterococcus faecalis* cytotoxin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*. 2003. Vol. 5, n° 10, p. 661-669
14. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999. Vol. 284, p. 1318–1322.
15. COX, Christopher; COBURN, Phillip; GILMORE, Michael. Enterococcal cytotoxin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Current protein & peptide science*. 2005; vol. 6, n°1, p. 77–84.
16. CRETÍ, Roberta; IMPERI, Mónica; BERTUCCINI, Lucia; FABRETTI, Francesca; OREFICI, Graziella; DI ROSA, Roberta; BALDASSARRI, Lucilla. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; vol. 53, n° 1, p. 13–20.
17. DA SILVA, Miguel; TIAGO, Igor; VERÍSSIMO, Antonio; BOAVENTURA, Rui; NUNES, Olga; MANAIA, Célia. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS microbiology ecology*. 2006; vol 55, n°2, p. 322–329.

18. DARGERÉ, Sylvie; VERGNAUD, Michel; VERDON, Renaud; SALOUX, Erick; LE PAGE, Oliver; LECLERCQ, Roland; BAZIN, Claude. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002 vol. 40, n° 6, p.2308-2310.
19. DE FÁTIMA, Maria; RIBEIRO, Tania; ABRANTES, Mata; MARQUES, José; TENREIRO, Rogerio; CRESPO, María. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*. 2005. Vol. 103, p. 191–198
20. DEVRIESE L, BAELE M, BUTAYE P. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy En: DWORKIN, Martin (edit.) *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*. Minnesota. Springer. 2006. 4:163–174
21. DEVRIESE LA., POT B, COLLINS MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal Applied Bacteriology*. 1993. Vol. 75, p.399–408.
22. DOUD, Carl. "The role of house flies in the ecology of enterococci from wastewater treatment facilities". Asesor: Ludek Zurek. Tesis Doctor de Filosofia, Departamento de Entomologia. College of Agriculture Kansas State University. Manhattan, Kansas. 2011.
23. EATON, Tracy; GASSON, Michael. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and environmental microbiology*. 2001, vol. 67, n° 4, p. 1628–1635.

24. FACKLAM R, BOSLEY GS, RHODEN D, FRANKLIN AR, WEAVER N, SCHULMAN R. Comparative evaluation of the API 20S and AutoMicrobic gram-positive identification systems for non-beta-hemolytic streptococci and aerococci. *Journal Clinical Microbiology*. 1985, vol. 21, n° 4, p.535-541.

25. FISHER, Katie; PHILLIPS, Carol. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Journal of Microbiology*. 2009. Vol. 155, p. 1749-1757.

26. FLORENCIA, María; HANCOCK, Lynn; VINAI, Thomas; PEREGO, Marta. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-Terminal proteolytic Cleavage. *Journal of bacteriology*. 2007, vol. 189, n° 24, p. 8835–8843.

27. FLORES, Wilfredo. Epidemiología de la colonización intestinal con enterococo resistente a vancomicina en pacientes de alto riesgo del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins. Lima, Perú. *Revista Medica Hered*. 2010, n° 21, p. 128–138.

28. FOLLI, Claudia; MANGIAROTTI, Laura; FOLLONI, Silvia; ALFIERI, Beatrice; GOBBO, Marina; BERNI, Rodolfo; RIVETTI, Claudio. Specificity of the TraA-DNA interaction in the regulation of the pPD1-encoded sex pheromone response in *Enterococcus faecalis*. *Journal Molecular Biology*. 2008. Vol. 380, p. 932–945.

29. FOULQUIE MORENO, MR; SARANTINOPOULOS, P; TSAKALIDOU, E; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and heath. *Inernational Food of Microbiology*. 2006. Vol 106, p. 1-24.

30. FRANZ, Charles; MUSCHOLL-SILBERHORN, Albrecht; YOUSIF, Nuha; VANCANNEYT, Marc; SWINGS, Jean; HOLZAPFEL, Wilhelm. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Enviromental Microbiology*. 2001. Vol. 67, n° 9, p. 4385–4389.

31. FREITAS, Ana; TEDIM, Ana; NOVAIS, Carla; RUIZ-GARBAJOSA, Patricia; WERNER, Guido; LAVERDE-GOMEZ, Jenny; CANTON, Rafael; PEIXE, Luisa; BAQUERO, Fernando; COQUEL, Teresa. Global Spread of the *hyl_{Efm}* Colonization-Virulence Gene in Megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010; vol. 54, n°. 6, p.2660–2665.

32. FUCHS, Beth; O'BRIEN, Elizabeth; KHOURY, Joseph; MYLONAKIS, Eleftherios. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Landes bioscience*. 2010. Vol. 1, n° 6, p. 475–482.

33. FUJIOKA RS. Indicators in marine recreational water quality. En: HURST, C.J. (edit). *Manual of environmental microbiology*. ASM Press Washington, D.C. 1997. p. 176-183

34. GARZA, Raúl; HERNÁNDEZ, Karen; MEJÍA, Adriana. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *Lab acta* 2002; vol.14, n°1, 9-10

35. GASPAR, Frédéric; TEIXEIRA, Neuza; RIGOTTIER-GOIS, Lionel; MARUJO, Paulo; NIELSEN-LEROUX C, BARRETO, Maria; SILVA, Maria de Fátima;

- SERROR, Pascale. Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. *Microbiology*. 2009. Vol.155, p. 2564-3571.
36. GENTRY-WEEKS, Claudia; ESTAY, Mónica; LOUI, Cindy; BAKER, Dale. Intravenous Mouse Infection Model for Studying the Pathology of *Enterococcus faecalis* Infections. *Infection and immunity*. 2003 vol. 71, n° 3, p.1434–1441.
37. GHANEM G, HACHEM R, JIANG Y, CHEMALY RF, RAAD I. Outcomes for and risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 vol. 28, n° 9, 1054-1059.
38. GONZÁLEZ ORTEGA, Maria Lilia. Enterococos : actualización. *Revista Habanera de Ciencias médicas*. 2010. Vol 9, n° 4, p. 507–515.
39. GUARDABASSI L, DALSGAARD A. Occurrence, structure, and mobility of Tn1546-Like elements in environmental isolates of vancomycin-Resistant enterococci. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(2):984–990.
40. GUERRERO Andres; ALVARADO, Débora. “Estudio de la diversidad de *Enterococcus* en áreas costeras de Lima”. En Libro de Resúmenes del XIV. Reunión Científica ICBAR. 2005. Lima Perú.
41. HANCOCK, Lynn; PEREGO, María. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186, n° 17, p. 5629–5639.

42. HARTKE, Axel; GIARD, Jean-Christopher; LAPLACE, Jean-Marie; AUFFRAY, Yanick. Survival of *Enterococcus faecalis* in Oligotrophic Microcosm: Changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of proteins synthesis. *Applied and environmental Microbiology*. 1998. Vol. 64, n° 11, p. 4238-4245.
43. HAYASHI, Hidenori; TAKAHASHI, Rei, NISHI, Takashiro; SAKAMOTO, Mitsuo; BENNO, Yoshimi. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Meddical Microbiology*. 2005. Vol. 54,n° 11, p.1093-101.
44. HEALTH PROTECTION AGENCY (2007). Bacteraemia. Disponible en www.hpa.org.uk
45. HEIMS, Sabina; LLEÒ, Maria del Mar; GUZMAN, Carlos; CANEPARI, Pietro. The viable but no culturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. 2002. *Journal of Bacteriology*. Vol. 184, n° 23, p. 6739-6745.
46. HEIKENS, Ester; BONTEN, Marc; WILLEMS Rob. Enterococcal Surface Protein Esp Is Important for Biofilm Formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of bacteriology*. 2007. Vol. 189, n° 22, p. 8233–8240.
47. HOSPITAL GUILLERMO ALMENARA IRIGOYEN. Reporte de acumulacion de datos de suceptibilidad microbiana. 2011. Disponible en: <http://www.slideshare.net/lrillescas/perfil-microbiolgico-del-hospital-g-almenara>.

48. HUFNAGEL, Markus; KOCH, Stefanie; CRETÍ, Roberta; BALDASSARRI, Lucilla; HUEBNER, Johannes. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *Journal of Infectious Diseases*. 2004. Vol. 189, n° 3, p. 420–430.
49. HUYCKE, Mark; GILMORE, Michael. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Plasmid*. 1995. Vol. 34, p. 152-156.
50. IKE Y, HASHIMOTO H, CLEWELL DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. *Infection and Immunity*. 1984. Vol. 45, p. 528-530.
51. IKE Y, CLEWELL DB. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *Zymogenes* can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. 1992. *Journal of Bacteriology*. Vol. 174, n° 24, p. 8172-8177.
52. JETT B, JENSEN HG, NORDQUIST RE, GILMORE MS. Contribution of the pADi-Encoded Cytolysin to the Severity of Experimental *Enterococcus faecalis* Endophthalmitis. *Infection and immunity*. 1992. Vol 60, n° 6, p. 2445–2452.
53. JETT B, HUYCKE M, GILMORE M. Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994. Vol. 7, n° 4, p. 462-478

54. KAJIURA T, WADA H, ITO K, ANZAI Y, KATO F. Conjugative Plasmid Transfer in the Biofilm Formed by *Enterococcus faecalis*. *Journal of health science*. 2006. Vol 52, n° 4, p. 358–367.

55. KALTINGER Megan. “EBSG, a novel surface protein, is involved in the biology of lipoteichoic acid in *enterococcus faecalis*”. Asesor: Helmut Hirt. Tesis de maestria en ciencias. Manhattan, Kansas Division of biology College of arts and sciences. Kansas state university, 2007

56. KAYAOGLU, Guven; ORSTAVIK, Dag. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol med*. 2004. Vol. 15, n° 5, p. 308-320.

57. KAYSER, FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*. 2003. Vol. 88, p255 – 262.

58. KRISTICH, Christopher; LI, Yung-Hua; CVITKOVITCH, Dennis; DUNNY, Gary. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186, n° 1, p. 154–163.

59. KUHN, Inger; IVERSEN, Aina; FINN, Maria; GREKO, Christina; BURMAN, Lars; BLANCH, Anicet; VILANOVA, Xavier; MANERO, Albert; TAYLOR, Huw; CAPLIN, Jonathan; DOMINGUEZ, LUCAS; MO“LLBY, Roland. Occurrence and relatedness of vancomycin- resistant Enterococci in animals, humans, and the environment in different european regions. *Applied Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, n° 9, p. 5383–5390

60. LATA, Pushpa; RAM, Siya; AGRAWAL, Madhoolika; SHANKER, Rishi. Enterococci in river Ganga surface waters : Propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC Microbiology*. 2009. Vol. 9, n° 140, disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/140>.

61. LAVERDE GOMEZ; Jenny; VAN SCHAIK, Willem, FREITAS, Ana; COQUE, Teresa; WEAVER, Keith; FRANCA, Maria; WITTE, Wolfgang; WERNER, Guido. A multiresistance megaplasmid pLG1bearing a hyl(Efm) genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011. Vol. 301, n° 2, p.165-175

62. LEBLANC,D. *Enterococcus*. En: DWORKIN, Martin (edit.)The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria. Minnesota. Springer. 2006. 4:175–204.

63. LEWIS, Kim. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001. Vol. 45, n° 4, p 999–1007.

64. LOPES, Maria; SIMOES, Ana; TENREIRO, Rogerio; FIGUEIREDO MARQUES, José, BARRETO CRESPO, Maria Teresa. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiol*. 2006. vol. 112, p. 208-214.

65. LUDWIG, Wolfgang; SEEWALDT, Elke; KILPPER-BÄLZ, Renato; SCHLEIFER, Karl; MAGRUM, Linda; WOESE, Carl; FOX, George; STACKEBRANDT, Erko. The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Genetic Microbiology*. 1985. Vol. 131, p. 543–551.

66. LUND B, EDLUND C, BILLSTROM H. Increased conjugation frequencies in clinical *Enterococcus faecium* strains harbouring the enterococcal surface protein gene esp. *Clinical microbiology and infection*. 2006. Vol. 12, n°6, p. 588–591.
67. MALANI, Preeti; DYKE, David; PAGANI, Francis; CHENOWETH, Carol. Nosocomial infections in left ventricular assist device recipients. *Clinical Infectious Diseases*. 2002. Vol. 34, n° 10, p.:1295-300.
68. MAROTHI, YA; AGNIHOTRI, H; DUBEY, D. Enterococcal resistance - an overview. *Indian journal of Medical Microbiology*. 2005. Vol. 23, n°4, p. 4-9.
69. MARRA, A; DIB-HAJJ, F; LAMB, L; KACZMAREK, F; SHANG, W; BECKIUS, G; MILICI, AJ; MAEDA, H; YAMAMOTO, T. Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. 1996. Vol. 377, p. 217-226.
70. MARTINEZ, S; LOPEZ, M; BERNARDO, A. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in Applied Microbiology*. 2003. Vol 37, 475–481.
71. MAUGERI, T; CARBONE, M; FERA, M; IRRERA, G; GUGLIANDOLO, C. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. Vol. 97, p. 354–361.
72. MOHAMED, Jamal; HUANG, Wenxiang; TENG, Fang; MURRAY, Barbara. "Influence of clinical origin and of various genes on biofilmformation by

Enterococcus faecalis". In Program Abstracts of the 43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003 abstract B-821, p. 52. Washington, DC: American Society for Microbiology.

73. MOHAMED, Jamal; HUANG, Wenxiang; NALLAPAREDDY, Sreedhar; TENG, Fang; MURRAY, Barbara. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*. 2004. Vol. 72, p. 3658-3663.
74. MOHAMED, Jamal; MURRAY, Barbara. Lack of Correlation of Gelatinase Production and Biofilm Formation in a Large Collection of *Enterococcus faecalis* Isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2005. Vol. 43, n° 10, p. 5405–5407.
75. MOHAMED, Jamal; HUANG, Wenxiang; NALLAPAREDDY, Sreedhar; TENG, Fang; MURRAY, Barbara. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 2004. Vol. 72, p. 3658–3663.
76. MOHAMED, Jamal; HUANG, Wenxiang; NALLAPAREDDY, Sreedhar; TENG, Fang; MURRAY, Barbara. Pleiotrophic effects of 2 *Enterococcus faecalis* sagA-like genes, salA and salB, which encode proteins that are antigenic during human infection, on biofilm formation and binding to collagen type I and fibronectin. *Journal of Infectious Diseases*. 2006. Vol. 193, p. 231–240.
77. MOHAMED, Jamal; MURRAY, Barbara. Influence of the *fsr* locus on biofilm formation by *Enterococcus faecalis* lacking gelE. *Journal Medical Microbiology*. 2006. Vol. 55, p. 1747–1750.

78. MONTRAVERS, Philips; ANDREMONT, Antonie; MASSIAS, Laurent; CARBON Claude. Investigation of the potential role of *Enterococcus faecalis* in the pathophysiology of experimental peritonitis. *Journal Infectious Diseases*. 1994. Vol. 169, p.821–830.
79. MUKHERJEE, Krishnendu; ALTINCICEK, Boran; HAIN, Torsten; DOMANN, Eugen; VILCINSKAS, Andreas; CHAKRABORTY, Trinad. *Galleria mellonella* as a Model System for Studying Listeria Pathogenesis. *Applied and environmental Microbiology*. 2010. vol. 76, n°. 1, p. 310–317.
80. MULLA SA, REVDIWALA S. Assessment of biofilm formation in device-associated clinical bacterial isolates in a tertiary level hospital. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2011. Vol. 54, p. 561-564.
81. MUNDY, LM; SHAM DF; GILMORE M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000. Vol 13: p. 513-522.
82. MURRAY, Barbara. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology*. 1990. Vol. 3: p. 46-65.
83. MURRAY, Barbara; WEINSTOCK, George. Enterococci: new aspects of an old organism. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1999. Vol. 111, p.328-334.
84. NAKAJO, K; IWAMI, Y; KOMORI, R; ISHIKAWA, S; UENO, T; SUZUKI, Y; TAKAHASHI N. The resistance to acidic and alkaline environments of

endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral microbiology and immunology*. Vol. 21, p. 283-288.

85. NES, Ingolf; DIEP, Dzung; HOLO, Helge. MINIREVIEWS Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of bacteriology*. 2007. Vol. 189, n° 4, 1189–1198.
86. NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999. *American Journal Infection Control*. 1999. Vol. 6, p.520-532.
87. NOBLE, RT; LEE, IM; SCHIFF, K. Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. vol. 96, p. 464–472.
88. NOVAIS, Carla; COQUE, Teresa; FERREIRA, Helena; SOUSA Johao; PEIXE Luisa. Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71, n° 6, p. 3364- 3368.
89. OANCEA, Claudia; KLARE, Ingo; WITTE, Wolfgang; WERNER, Guido. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; vol. 54, n°1, p. 232–235.
90. PANESSO BOTERO, Diana. “Caracterización molecular de la virulencia transferible de *Enterococcus faecium* de origen nosocomial”. Asesor: Cesar A.

Arias. Tesis Titulo PhD. Pontificia Universidad Javeriana. Fac. Ciencias Básicas. Bogotá. 2010.

91. PANESSO, Diana; REYES, Jinnthe; RINCON, Sandra; DIAZ, Lorena; GALLOWAY-PEÑA, Jessica; ZURITA, Jeannete; CARRILLO, Carlos; MERENTES, Altagracia; GUZMAN, Manuel; ADACHI, Javier; MURRAY, Barbara; ARIAS, Cesar. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* : a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. *Journal of clinical microbiology*. 2010; vol. 48, n° 5, p.1562–1569.
92. PANESSO, Diana; MONTEALEGRE, MC, RINCÓN, Sandra; MOJICA, MF; RICE, LB; SINGH, KB; MURRAY Barbara; ARIAS, Cesar. The hyl_{Efm} gene in pHyl_{Efm} of *Enterococcus faecium* is not required in pathogenesis of murine peritonitis. *BMC Microbiology* 2011. Doi: 10.1186/1471-2180-11-20.
93. PARK, Shin Yong; KIM, Mi Kim; LEE, Joon Ha; SEO, Sook; LEE, Hee. Extracellular Gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a Defense System in Insect Hemolymph and Human Serum. 2007 *infection and immunity*, vol 75. No 4, pp. 1861–1869
94. PELEG, Anton; JARA, Sebastian; MONGA, Divya; ELIOPOULOS, George; MOELLERING, Robert; ELEFThERIOS, Mylonakis. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009. vol. 53, n° 6, p. 2605–2609.
95. PILLAI, Satish; SAKOULAS, George; ELIOPOULOS, George; MOELLERING, Robert; MURRAY, Barbara; INOUE, Roger. Effects of glucose on fsr-mediated

biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infectious Diseases*. 2004. Vol. 190, p. 967–970.

96. PIRES-BOUCAS, Patricia; IZUMI, Erika; FURLANETO, Luciana; STURION, Leonardo; SUZART, Sergio. Effects of environmental and nutritional factors on gelatinolytic activity by *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *African Journal Microbiology Research*. 2010. Vol. 4, n° 10, p. 969-976.
97. QUIÑONES, Diana. “*Enterococcus* aislados de Cuba: Resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética”. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Médicas. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri. Departamento de Bacteriología-Micología. 2010.
98. QIN, Xiang; SINGH, Kavindra; WEINSTOCK, George; MURRAY, Barbara. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. *Infection and immunity*. 2000. Vol. 68, n° 5, p. 2579–2586.
99. RICE, Louis; CALDERWOOD, Stephen; ELIOPOULOS, George; FARBER, Bruce; KARCHMER, Adolf. Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease. *Clinical Infectious Diseases*. 1991. vol.13, n° 1, p. 1-7.
100. RICE, E; MESSER, J; JOHNSON, C. Occurrence of High-Level Aminoglycoside Resistance in Environmental Isolates of Enterococci. *Applied and environmental Microbiology*. 1995. Vol. 61, n° 1, p. 374–376.

101. RICE, Louis; CARIAS, Leonore; RUDIN, Susan; VAEL, Carl; GOOSSENS, Hernan; KONSTABEL, Carola; KLARE, Ingo; NALLAPAREDDY, Sreedhar; HUANG, Wenxiang; MURRAY, Barbara. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *Journal Infectious Diseases*. 2003. Vol. 187, p. 508–512.
102. SALBATIER, Melissa; OSORIO, Soledad; FAJARDO, W; RONCAL, Fausto; OLIVARES, V. Caracterización fitoplanctónica del área costera Del callao-Perú, afectada por aguas residuales. *Biologist*. 2008. Vol. 6: p. 135-145
103. SAVA, I; HEINKENS, E; HUBNER, J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology Infection*. 2010. Vol. 16 533-540.
104. SCHAREK L, GUTH J, REITER K, WEYRAUCH KD, TARAS D, SCHWERK P, ET AL. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2005. vol. 105, p.151-161
105. SCHLEIFER. KH; KILPPER, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev.as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 1984, vol. 34, p.31-34.
106. SHANKAR, N; BAGHDAYAN, AS; GILMORE, MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 1991. Vol. 417, p. 746-750.

107. SHANKAR, Viswanathan; BAGHDAYAN, Arto; HUYCKE, Mark; LINDAHL, Gunnar; GILMORE, Michel. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strain is enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. 1999. *Infection and Immunity*. Vol. 67, p. 193-200.
108. SEITZ, V; CLERMONT, A; WEDDE, M; HUMMEL, M; VILCINSKAS, A; SCHLATTERER, K; PODSIADLOWSKI, L. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. *Developmental. Comparative Immunology*. 2003. Vol. 27, p.207–215.
109. SENO, Yuco; KARIYAMA, Reiko; MITSUHATA, Ritsuko; MONDEN, Koichi, KUMON, Hiromi. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta medica Okayama*. 2005. Vol. 59, p.79–87.
110. SIFRI, Costi; MYLONAKIS, Eleftherios; SINGH, Kavindra; QIN, Xiang; GARSIN, Daniel; MURRAY, Barbara; AUSUBEL, Frederick; CALDERWOOD, Stephen. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infection and Immunity*. 2002. Vol. 70, p. 5647–5650.
111. SIGNORETTO, Caterina; BURLACCHINI, Gloria; LLEO, Maria del Mar; PRUZZO, Carla; ZAMPINI, Massimiliano; PANE, Luigui; FRANZINI, Giorgio; CANEPARI, Pietro. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. 70: 6892-6896.

112. SILVA, Juan; LOYOLA, Patricia; GALLEGUILLOS, Juan; RODRÍGUEZ, Yara; COLQUE-NAVARRO, Patricia; MÖLLBY, Roland; KÜHN, Inger. Prevalencia de enterococos resistentes a antibioticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Techniques*. 2005. Vol. 133, n° 10, p. 1201–1210.
113. SOOD, S; MALTHOTRA, M; DAS, B; KAPIL, A. Enterococcal infection and antimicrobial resistance. *Indian Medical Research*. 2008; 128: 111- 121
114. STEPANOVIC, S; JOVANOVIC, M; LAVADINOVIC, L; STOS, B. Case Report *Enterococcus durans* endocarditis in a patient with transposition of the great vessels. *Journal of Medical Microbiology*. 2004, vol. 53, n° 3, p. 259–261.
115. STICKLER, DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature clinical practice Urology*. 2008. Vol. 5, n° 11, p. 598–608.
116. SUMI JÁUREGUI, Ada Lizbeth. "Transferencia de plásmidos con resistencia a antibióticos en especies de *Enterococcus* provenientes del Mar de Lima" Asesora: Ruth Garcia. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2008
117. TENDOLKAR, Preeti; BAGHDAYAN, Arto; GILMORE, Michael; SHANKAR, Nathan. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunology*. 2004. Vol. 72, n° 10, p. 6032-6039.
118. TENDOLKAR, Preeti; BAGHDAYAN Arto; SHANKAR, Nathan. Cellular and Molecular Life Sciences Pathogenic enterococci : new developments in the 21 st century. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003. Vol 60, p. 2622– 2636.

119. TENDOLKAR, Preeti; BAGHDAYAN, Arto; SHANKAR, Nathan. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *Journal of. Bacteriology*. 2005. Vol. 188, p. 2063-2072.
120. TILL, Michele; WIXSON, Richard; PERTEL, Peter. Linezolid treatment for osteomyelitis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clinical Infectious Diseasses*. 2002. Vol 34, n° 10, p.1412-1414.
121. TOLEDO-ARANA, Alejandro; VALLE, Jaione; SOLANO, Cristina, ARRIZUBIETA, María; CUCARELLA, Carme; LAMATA, Marta; AMORENA, Beatriz; LEIVA, José; PENADES, José; LASA Iñigo. The Enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67, p. 4538-4545.
122. TURBOW, David; OSGOOD, Nathaniel; JIANG, Sunny. Evaluation of recreational health risk in coastal waters based on Enterococcus densities and bathing Patterns. *Environmental Health Perspectives*. 2003. vol. 111, n° 4, p. 598-603.
123. UPADHYAYA, PM; RAVIKUMAR, G; UMAPATHY, BL. Review of virulence factors of *Enterococcus* : an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2009. Vol. 27, p. 301–305.
124. VAN DEN BERGHE E, DE WINTER T, DE VUYST L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient

depletion. *International Journal of Food Microbiology*. 2006. Vol. 107, p. 159–170.

125. VANKERCKHOVEN, Vanessa; AUTGAERDEN, Tim Van; VAEL, Carl; LAMMERS, Christine; CHAPELLE, Sabine; ROSSI, Rosaria; JABES, Daniela; GOOSSENS, Hernan. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. Vol 42, n°10, p. 4473–4479.
126. VANKERCKHOVEN, Vanessa; HUYS, Geert; VANCANNEYT, Marc; SNAUWAERT, Cindy; SWINGS, Jean; KLARE, Ingo; WITTE, Wolfgang; AUTGAERDEN, Tim Van; CHAPELLE, Sabine; LAMMENS, Christine; GOOSSENS, Herman. Genotypic Diversity, Antimicrobial Resistance, and Virulence Factors of Human Isolates and Probiotic Cultures Constituting Two Intraspecific Groups of *Enterococcus faecium* Isolates. *Applied and environmental microbiology*. 2008; vol. 74, n° 14, p. 4247–4255.
127. VILANOVA, X; MANERO, A; CERDA, M. The effect of a sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river waters. *Journal of Applied Microbiology*. 2002. Vol. 92, p. 210–214.
128. VILMOS, Peter; KURUCZ, Eva. Insect immunity : evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology letters*. 1998. vol. 62, pp. 59–66.

129. WILLIAMS, AM; RODRIGUES, UM; COLLINS, MD. Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Research in Microbiology*. 1991. Vol. 142, p.67–74.
130. WILLEMS, Rob; HOMAN, Wieger; TOP, Janetta; VAN SANTEN-VERHEUVEL, Marga; TRIBE, David; MANZIOROS, Xenia. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet*. 2001. Vol. 357, p. 853-8555.
131. ZENG, Jing; TENG, Fang; MURRAY, Barbara. Gelatinase Is important for Translocation of *Enterococcus faecalis* across Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells. *Infection and Immunity*. 2005. Vol. 73, n° 3, p. 1606–1612.

9. ANEXOS

Anexo 1. Iniciadores para el desarrollo de PCR múltiplex

GEN	FACTOR DE VIRULENCIA	NOMBRE DE INICIADORES	SECUENCIA NUCLEOTIDICA (5'-3')	TAMAÑO DE PRODUCTO (PB)
<i>gelE</i>	Gelatinasa	GEL 11 GEL 12	TATGACAATGCTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213
<i>cytA</i>	Citolisina	CYT I CYT IIb	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688
<i>esp</i>	Proteína de superficie enterocócica	ESP 14F ESP 12R	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510
<i>hyl</i>	Hialuronidasa	HYL n1 HYL n2	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276

(Fuente: Vankerckhoven *et al.*,2004)

Anexo 2. Protocolo del mix PCR para una reacción de PCR multiplex

REACTIVO	[STOCK]	VOLUMEN	[FINAL]
Agua Ultrapura	-	25 uL	-
Buffer PCR	10X	5 uL	X
MgCl ₂	25 mM	4 uL	2 mM
dNTP`s	2.5 mM	4 U	0.2 mM
Iniciadores			
GelE [F]	10 uM	0.5 ul	0.1 uM
GelE [R]	10 uM	0.5 ul	0.1 uM
Hyl [F]	10 uM	0.5 ul	0.1 uM
Hyl [R]	10 uM	0.5 ul	0.1 uM
CytA [F]	10 uM	1 ul	0.2 uM
CytA [R]	10 uM	1 ul	0.2 uM
Esp [F]	10 uM	1 ul	0.2 uM
Esp [R]	10 uM	1 ul	0.2 uM
Taq polimerasa	1 U/ul	2 ul	2 U
Extracc.ADN	-	4 ul	-
Volumen por reacción		50 ul	

Anexo 3. Actividad hemolítica por cepa de enterococos marinos

	CODIGO	ESPECIE	ATH 5% SANGRE HUMANA	RESULTADO
C+	Efc283	<i>E. faecalis</i>	Beta hemólisis	Positivo
1	Efc17	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
2	Efc18	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
3	Efc26	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
4	Efc27	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
5	Efc42	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
6	Efc43	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
7	Efc92	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
8	Efm7	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
9	Efm13	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
10	Efm14	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
11	Efm65	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
12	Efm66	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
13	Efm70	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
14	Efm82	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
15	Efm89	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
16	Efm109	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
17	Ed2	<i>E. durans</i>	Gamma hemolisis	Negativo
18	Ed4	<i>E. durans</i>	Gamma hemolisis	Negativo
19	Ed5	<i>E. durans</i>	Gamma hemolisis	Negativo
20	Ed10	<i>E. durans</i>	Alpha hemolisis	Negativo
21	Ed12	<i>E. durans</i>	Alpha hemolisis	Negativo
22	Ed30	<i>E. durans</i>	Alpha hemolisis	Negativo
23	Ed32	<i>E. durans</i>	Alpha hemolisis	Negativo
24	Ed33	<i>E. durans</i>	Gamma hemolisis	Negativo
25	Ed90	<i>E. durans</i>	Gamma hemolisis	Negativo
26	Eh8	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
27	Eh15	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
28	Eh20	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
29	Eh21	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
30	Eh22	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
31	Eh23	<i>E. hirae</i>	Alpha hemolisis	Negativo
32	Eh29	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
33	Eh31	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo
34	Eh40	<i>E. hirae</i>	Gamma hemolisis	Negativo

Hemólisis sobre agar Todd Hewitt con 5% de sangre humana defibrinada. Incubación por 48 horas en cámara con CO₂. Betahemólisis: degradación total, alpha hemólisis: degradación parcial, gamma hemólisis: no hemólisis.

Anexo 4. Actividad hemolítica por cepa de enterococos clínicos

	CODIGO	ESPECIE	ATH 5% SANGRE HUMANA	RESULTADO
C+	Efc283	<i>E. faecalis</i>	Beta hemólisis	Positivo
1	Efc22031121	<i>E. faecalis</i>	Beta hemólisis	Positivo
2	Efc05051123	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
3	Efc05051126	<i>E. faecalis</i>	Beta hemolisis	Positivo
4	Efc03051122	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
5	Efc05051127	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
6	Efc13061120	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
7	Efc09051117	<i>E. faecalis</i>	Beta hemolisis	Positivo
8	Efc06031105	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemolisis	Negativo
9	Efc05111007	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemólisis	Negativo
10	Efc08071124	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemólisis	Negativo
11	Efc188 – 11	<i>E. faecalis</i>	Gamma hemólisis	Negativo
12	Efm12031119	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
13	Efm09031122	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
14	Efm12031120	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
15	Efm30061115	<i>E. faecium</i>	Alpha hemolisis	Negativo
16	Efm28021109	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
17	Efm21081103	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
18	Efm10081113	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
19	Efm19081113	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
20	Efm06111009	<i>E. faecium</i>	Alpha hemólisis	Negativo
21	Efm27111008	<i>E. faecium</i>	Gamma hemolisis	Negativo
22	Efm13121013	<i>E. faecium</i>	Gamma hemólisis	Negativo
23	Efm23021118	<i>E. faecium</i>	Gamma hemólisis	Negativo
24	Efm02041112	<i>E. faecium</i>	Alpha hemólisis	Negativo
25	Efm22121004	<i>E. faecium</i>	Beta hemólisis	Positivo
26	Efm18111018	<i>E. faecium</i>	Gamma hemólisis	Negativo
27	Efm07031113	<i>E. faecium</i>	Gamma hemólisis	Negativo
28	Efm09021123	<i>E. faecium</i>	Gamma hemólisis	Negativo
29	Efm314-11	<i>E. faecium</i>	Gamma hemólisis	Negativo
30	Eh118-4 ^a	<i>E. hirae</i>	Alpha hemolisis	Negativo
31	Ed118-4B	<i>E. durans</i>	Gamma hemólisis	Negativo
32	Ent 189 – 11	<i>E. raffinosus</i>	Alpha hemolisis	Negativo
33	Ent757-10	<i>E. avium</i>	Gamma hemolisis	Negativo

Hemólisis sobre agar Todd Hewitt con 5% de sangre humana defibrinada. Incubación por 48 horas en cámara con CO₂. Betahemólisis: degradación total, alpha hemólisis: degradación parcial, gamma hemólisis: no hemólisis.

Anexo 5. Formación de biopelículas: determinación de la concentración óptima de glucosa

[GLUCOSA]	Cepa	ABSORBANCIA (492 nm con referencia a 630 nm)												PROM	D.S.
		L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀	L ₁₁	L ₁₂		
0% glucosa	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.048	0.049	0.041	0.042	0.041	0.047	0.043	0.036	0.041	0.038	0.046	0.041	0.043	0.004
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.015	0.013	0.016	0.017	0.011	0.013	0.018	0.014	0.012	0.017	0.013	0.015	0.015	0.002
0.5% glucosa	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.052	0.058	0.062	0.058	0.058	0.056	0.053	0.061	0.061	0.057	0.061	0.053	0.058	0.003
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.018	0.016	0.020	0.019	0.022	0.019	0.020	0.021	0.019	0.017	0.021	0.020	0.019	0.002
0.75% glucosa	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.134	0.138	0.136	0.143	0.152	0.144	0.142	0.146	0.134	0.145	0.154	0.142	0.143	0.006
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.018	0.021	0.023	0.019	0.022	0.028	0.020	0.021	0.024	0.017	0.021	0.022	0.021	0.003

Lectura de la absorbancia a 492 nm con referencia a 630 nm. Se realizaron 4 repeticiones con 3 réplicas de las cepas de control incubados en caldo TSB (0%, 0.5%, 0.75% glucosa). Control positivo: *P. aeruginosa* ATCC 27853; Control negativo: *S. aureus* ATCC 25923.

Anexo 6. Formación de biopelículas: determinación de los intervalos de clasificación

(TSB 0.75%glucosa)

PATRONES	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀	L ₁₁	L ₁₂	PROM	S.D.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.134	0.138	0.136	0.143	0.152	0.144	0.142	0.146	0.134	0.145	0.154	0.142	0.143	0.006
<i>E. faecalis</i> JH2-2	0.032	0.034	0.035	0.033	0.036	0.032	0.037	0.033	0.033	0.032	0.036	0.034	0.034	0.002
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0.018	0.021	0.023	0.019	0.022	0.028	0.020	0.021	0.024	0.017	0.021	0.022	0.021	0.003
C.M. (DOc)	0.009	0.011	0.008	0.011	0.012	0.009	0.013	0.011	0.009	0.012	0.008	0.013	0.011	0.002

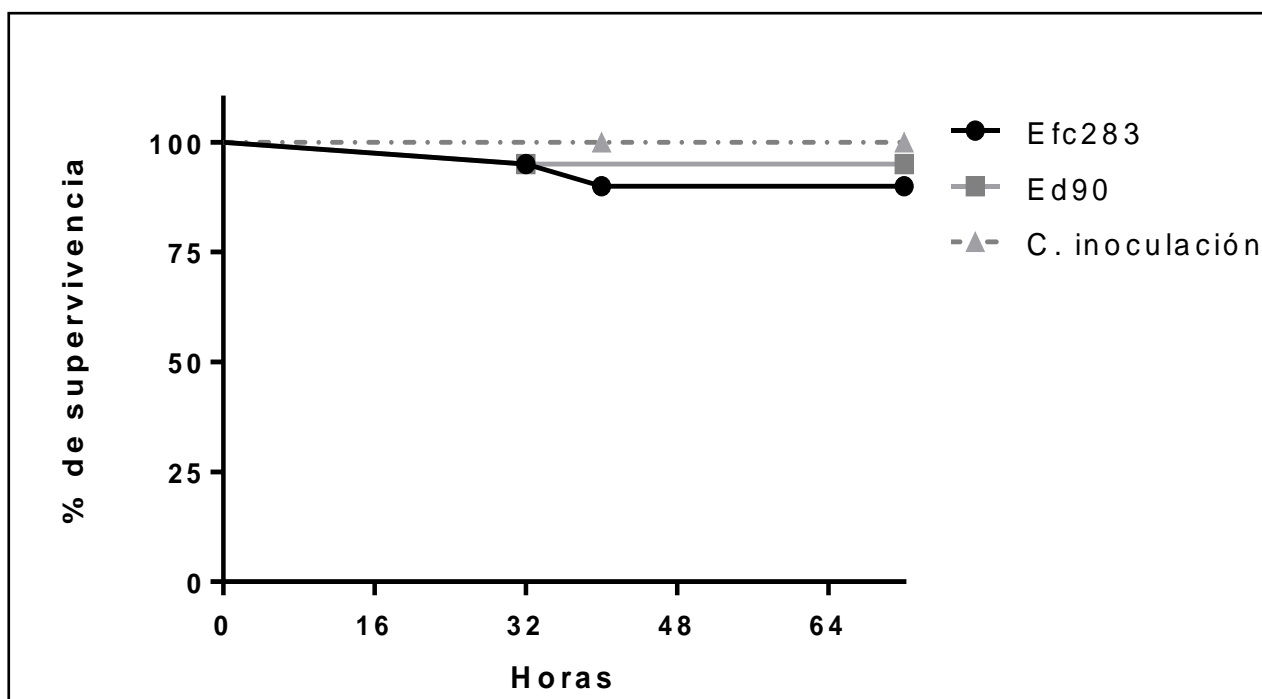
CLASIFICACIÓN	MIN	LECTURA	MAX
No formadora		D.O.	< 0.011
Débil	0.011 <	D.O.	< 0.022
Moderado	0.022 <	D.O.	< 0.044
Fuerte	0.044 <	D.O.	

Determinación de los intervalos de clasificación de las biopelículas mediante la lectura de la absorbancia a 492 nm con referencia a 630 nm. Se realizaron 4 repeticiones con 3 réplicas de las cepas de control incubados en caldo TSB (0.75% glucosa). Controles: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (fuerte productor); *E. faecalis* JH2-2 (moderado productor) y *S. Aureus* ATCC 25923 (débil productor); CM: Control del medio sin inocular (Densidad óptica de control). DO: Densidad óptica. Tipo de biopelícula: débil ($DO \leq 2DOc$), moderado ($2DOc < DO \leq 4DOc$) y Fuerte ($4DOc < DO$).

Anexo 7. Formación de biopelículas: efecto de la glucosa sobre la producción de biopelículas en cepas de estudio.

TSB	PATRONES	L1	L2	L3	L4	PROMEDIO	S.D.
0% glucosa	<i>E. faecalis</i> Efc05/23	0.051	0.047	0.049	0.043	0.048	0.003
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	0.021	0.024	0.025	0.023	0.023	0.002
	<i>E. faecium</i> Efm12/20	0.015	0.017	0.017	0.017	0.017	0.001
0.50% glucosa	<i>E. faecalis</i> Efc05/23	0.105	0.111	0.113	0.107	0.109	0.004
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	0.030	0.031	0.027	0.029	0.029	0.002
	<i>E. faecium</i> Efm12/20	0.017	0.021	0.020	0.019	0.019	0.002
0.75% glucosa	<i>E. faecalis</i> Efc05/23	0.192	0.225	0.192	0.173	0.196	0.022
	<i>E. faecalis</i> JH2-2	0.035	0.034	0.035	0.032	0.034	0.001
	<i>E. faecium</i> Efm12/20	0.019	0.021	0.020	0.021	0.020	0.001

Efecto de la concentración de Glucosa sobre la formación de biopelículas. Crecimiento en caldo TSA con carbohidrato (0, 0.5 y 0.75% glucosa) sobre placas de microtitulación de poliestireno a 37°C.

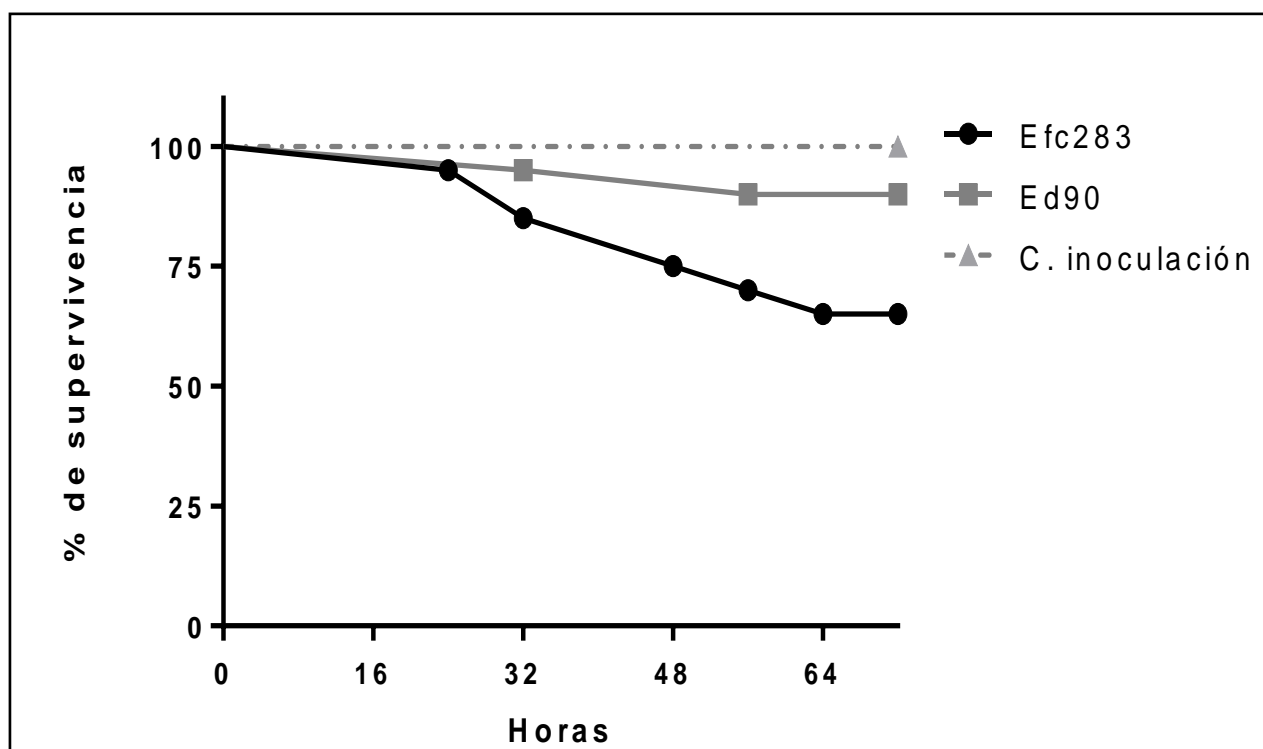


Anexo 8. Supervivencia de *G. mellonella*; estimación de la dosis infectiva

(Dosis: 10^4 ufc/larva)

Curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas de control administradas a grupos de 20 larvas de *G. mellonella* (dosis: 10^4 UFC/larva). La supervivencia es superior al 75% en ambas cepas de control. No existen diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia ($P_{\text{valor}} = 0.5603$).

COMPARACIÓN DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA	Dosis: 10^4 UFC/larva
Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi cuadrado	0.3391
Df	1
P valores	0.5603
Resumen P valores	Ns
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?	No
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	
Chi cuadrado	0.3165
Df	1
P valores	0.5737
Resumen P valores	Ns
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?	No

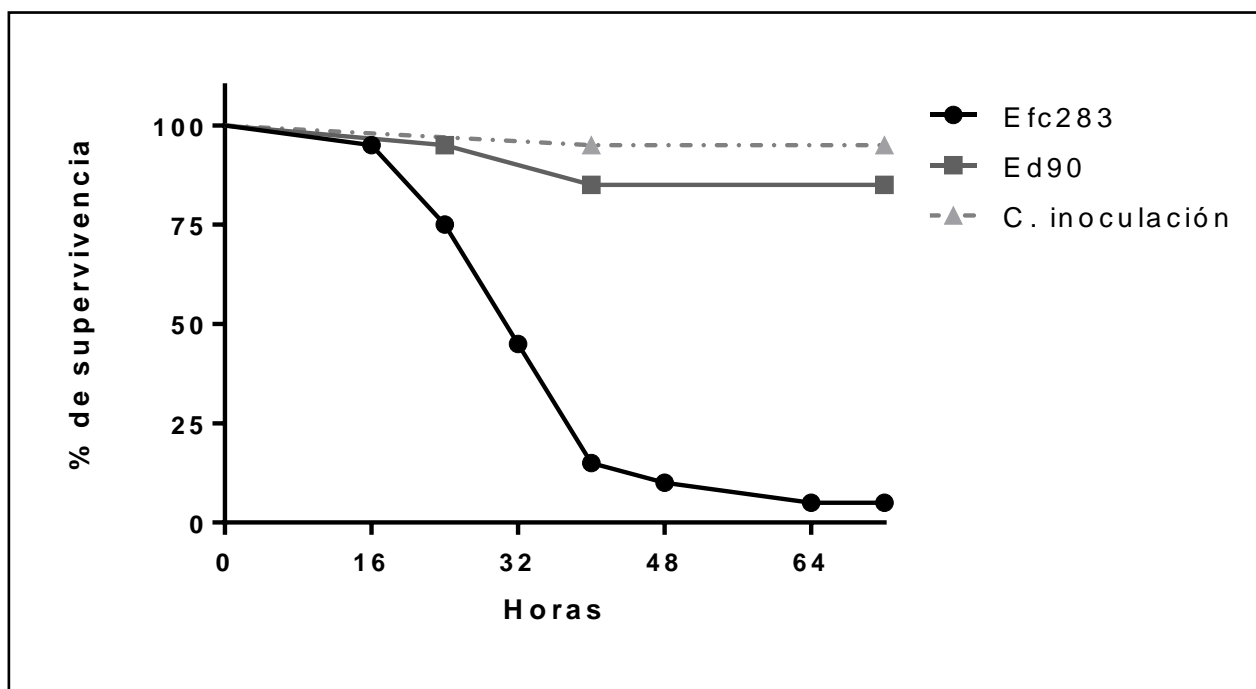


Anexo 9. Supervivencia de *G. mellonella*; estimación de la dosis infectiva

(Dosis: 10^5 ufc/larva)

Curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas de control administradas a grupos de 20 larvas de *G. mellonella* (dosis: 10^5 UFC/larva). La supervivencia es cercana al 60%. No existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de ambas cepas de control ($P_{\text{valor}} = 0.0596$).

COMPARACIÓN DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA	Dosis: 10^5 UFC/larva
Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi cuadrado	3.549
Df	1
P valores	0.0596
Resumen P valores	Ns
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?	No
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	
Chi cuadrado	3.503
Df	1
P valores	0.0613
Resumen P valores	Ns
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?	No

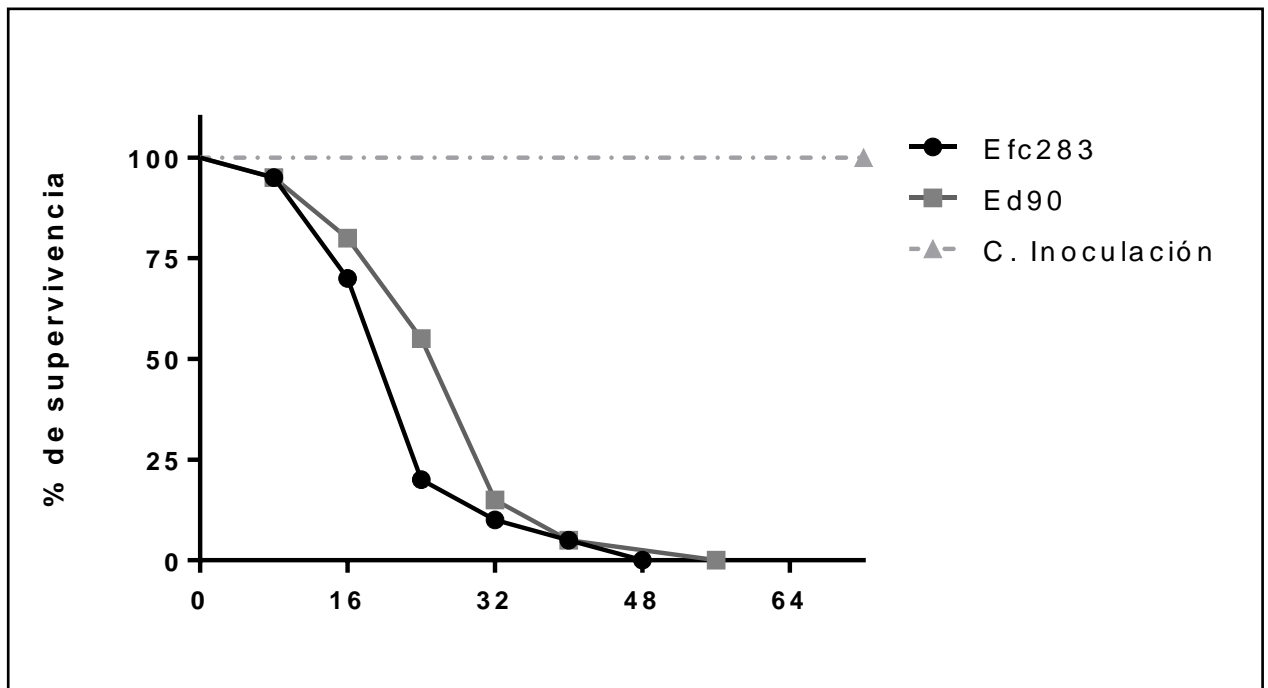


Anexo 10. Supervivencia de *G. mellonella*; estimación de la dosis infectiva

(Dosis: 10^6 ufc/larva)

Curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas de control administradas a grupos de 20 larvas de *G. mellonella* (dosis: 10^6 UFC/larva). La supervivencia media de la cepa positiva se alcanza a las 32 horas. Si existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de ambas cepas controles ($P_{\text{valor}} < 0.0001$).

COMPARACIÓN DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA	Dosis: 10^6 UFC/larva
Log-rank (Mantel-Cox) test	
Chi cuadrado	27.11
Df	1
P valores	< 0.0001
Resumen P valores	****
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?	Si
Gehan-Breslow-Wilcoxon test	
Chi cuadrado	22.72
Df	1
P valores	< 0.0001
Resumen P valores	****
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?	Si



Anexo 11. Supervivencia de *G. mellonella*; estimación de la dosis infectiva

(Dosis: 10^7 ufc/larva)

Curva de supervivencia Kaplan-Meier; cepas de control administradas a grupos de 20 larvas de *G. mellonella* (dosis: 10^7 UFC/larva). Letalidad al 100% alcanzada a las 48 y 56 horas. No se observan diferencias significativas (P_{valor} : 0.1162).

COMPARACIÓN DE CURVAS DE SUPERVIVENCIA		Dosis: 10^7 UFC/larva
Log-rank (Mantel-Cox) test		
Chi cuadrado		2.468
Df		1
P valores		0.1162
Resumen P valores		Ns
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?		No
Gehan-Breslow-Wilcoxon test		
Chi cuadrado		2.77
Df		1
P valores		0.096
Resumen P valores		ns
¿Son las curvas de supervivencia significativamente diferentes?		No

Anexo 12. Frecuencias acumuladas de mortalidad de *G. mellonella* por enterococos marinos

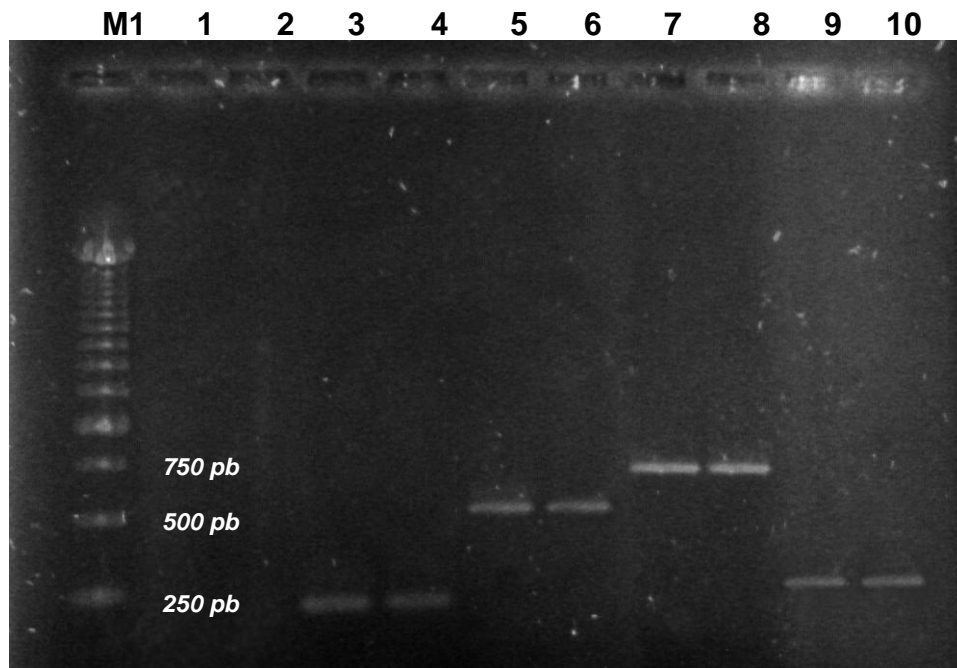
N°	CODIGO	ESPECIE	DGV	DFV	8 H.	16 H.	24 H.	32 H.	40 H.	48 H.	56 HR.	64 H.
1	Efc17	<i>E. faecalis</i>	<i>gelE+</i>	Bp++	0.00	0.00	0.05	0.10	0.20	0.25	0.25	0.25
2	Efc18	<i>E. faecalis</i>	<i>esp+</i>	Bp+	0.00	0.05	0.15	0.20	0.20	0.30	0.30	0.30
3	Efc26	<i>E. faecalis</i>	-	Bp+	0.00	0.00	0.00	0.05	0.15	0.20	0.20	0.20
4	Efc27	<i>E. faecalis</i>	<i>gelE+</i>	GEL+/Bp+	0.00	0.00	0.05	0.10	0.40	0.70	0.70	0.70
5	Efc42	<i>E. faecalis</i>	<i>esp+</i>	Bp++	0.00	0.05	0.05	0.10	0.20	0.30	0.30	0.30
6	Efc43	<i>E. faecalis</i>	<i>esp+</i>	Bp++	0.00	0.05	0.05	0.15	0.20	0.35	0.35	0.35
7	Efc92	<i>E. faecalis</i>	<i>gelE+</i>	Bp+	0.00	0.00	0.00	0.10	0.15	0.25	0.25	0.25
8	Efm14	<i>E. faecium</i>	<i>esp+/gelE</i>	Bp-	0.00	0.00	0.10	0.15	0.20	0.30	0.30	0.30
9	Efm66	<i>E. faecium</i>	-	Bp++	0.00	0.00	0.00	0.05	0.15	0.15	0.15	0.15
10	Efm70	<i>E. faecium</i>	<i>gelE+</i>	Bp+	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.15	0.15	0.15
11	Ed10	<i>E. durans</i>	<i>gelE+</i>	Bp++	0.00	0.00	0.00	0.05	0.10	0.10	0.15	0.15
12	Ed32	<i>E. durans</i>	<i>gelE+</i>	Bp++	0.00	0.00	0.00	0.05	0.15	0.20	0.25	0.25
13	Eh23	<i>E. hirae</i>	-	Bp+	0.00	0.00	0.00	0.05	0.15	0.15	0.15	0.15
14	Eh40	<i>E. hirae</i>	-	Bp++	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.15	0.15	0.15

Abreviaturas: DGV: Determinantes genéticos de virulencia; DFV: Determinante fenotípico de virulencia; H.: Horas; BH+: Betahemólisis; GEL: gelatinasa; Bp: Biopelícula (+ moderada; ++ fuerte)

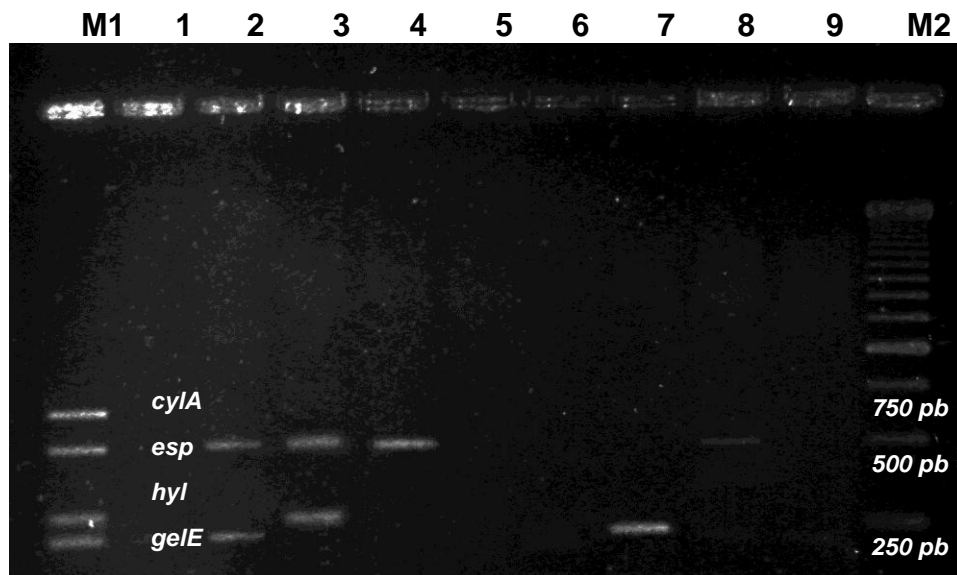
Anexo 13. Frecuencias acumuladas de mortalidad de *G. mellonella* por enterococos clínicos

Nº	CODIGO	ESPECIE	DGV	DFV	8 H.	16 H.	24 H.	32 H.	40 H.	48 H.	56 H.	64 H.
1	Efc22/21	<i>E. faecalis</i>	<i>cylA</i> +/ <i>gelE</i> +	GEL+/BH+/Bp++	0.00	0.00	0.40	0.55	0.75	0.90	1.00	1.00
2	Efc09/17	<i>E. faecalis</i>	<i>esp</i> +/ <i>cylA</i> +/ <i>gelE</i> +	GEL+/BH+/Bp++	0.00	0.30	0.50	0.85	1.00	1.00	1.00	1.00
3	Efc06/05	<i>E. faecalis</i>	<i>esp</i> +/ <i>gelE</i> +	GEL+/Bp++	0.00	0.05	0.25	0.70	0.80	0.90	0.95	1.00
4	Efc05/23	<i>E. faecalis</i>	<i>gelE</i> +	GEL+	0.00	0.00	0.25	0.45	0.75	0.80	0.85	0.95
5	Efc05/26	<i>E. faecalis</i>	<i>esp</i> +/ <i>cylA</i> +/ <i>gelE</i> +	BH+/Bp++	0.00	0.20	0.45	0.75	0.80	0.90	1.00	1.00
6	Efc08/24	<i>E. faecalis</i>	<i>esp</i> +	Bp++	0.00	0.05	0.20	0.30	0.35	0.45	0.45	0.45
7	Efm22/04	<i>E. faecium</i>	<i>cylA</i> +/ <i>gelE</i> +	BH+/Bp+	0.00	0.00	0.10	0.40	0.60	0.75	0.75	0.75
8	Efm12/20	<i>E. faecium</i>	<i>gelE</i> +	GEL+	0.00	0.00	0.20	0.35	0.55	0.65	0.65	0.70
9	Efm09/22	<i>E. faecium</i>	<i>CylA</i> +	-	0.00	0.00	0.10	0.25	0.35	0.45	0.55	0.60
10	Efm10/13	<i>E. faecium</i>	<i>esp</i> +/ <i>gelE</i> +	Bp+	0.00	0.00	0.20	0.25	0.35	0.45	0.45	0.45
11	Efm06/09	<i>E. faecium</i>	<i>esp</i> +/ <i>hyl</i> +	Bp+	0.00	0.00	0.15	0.20	0.40	0.60	0.65	0.65
12	Efm18/18	<i>E. faecium</i>	<i>esp</i> +/ <i>hyl</i> +	-	0.00	0.00	0.00	0.10	0.15	0.35	0.45	0.50
13	Efm02/12	<i>E. faecium</i>	<i>esp</i> +/ <i>hyl</i> +	-	0.00	0.00	0.05	0.05	0.15	0.45	0.55	0.55
14	Efm07/13	<i>E. faecium</i>	<i>gelE</i> +	GEL+/Bp++	0.00	0.00	0.15	0.35	0.55	0.85	0.85	0.85
15	Eh188-4A	<i>E. hirae</i>	<i>gelE</i> +	-	0.00	0.00	0.05	0.10	0.10	0.20	0.20	0.20
16	Ed188-4B	<i>E. durans</i>	-	-	0.00	0.00	0.05	0.05	0.15	0.15	0.15	0.15
17	Ent 189 - 11	<i>E. raffinosus</i>	-	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.05
18	Ent 757-10	<i>E. avium</i>	-	-	0.00	0.00	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	0.10

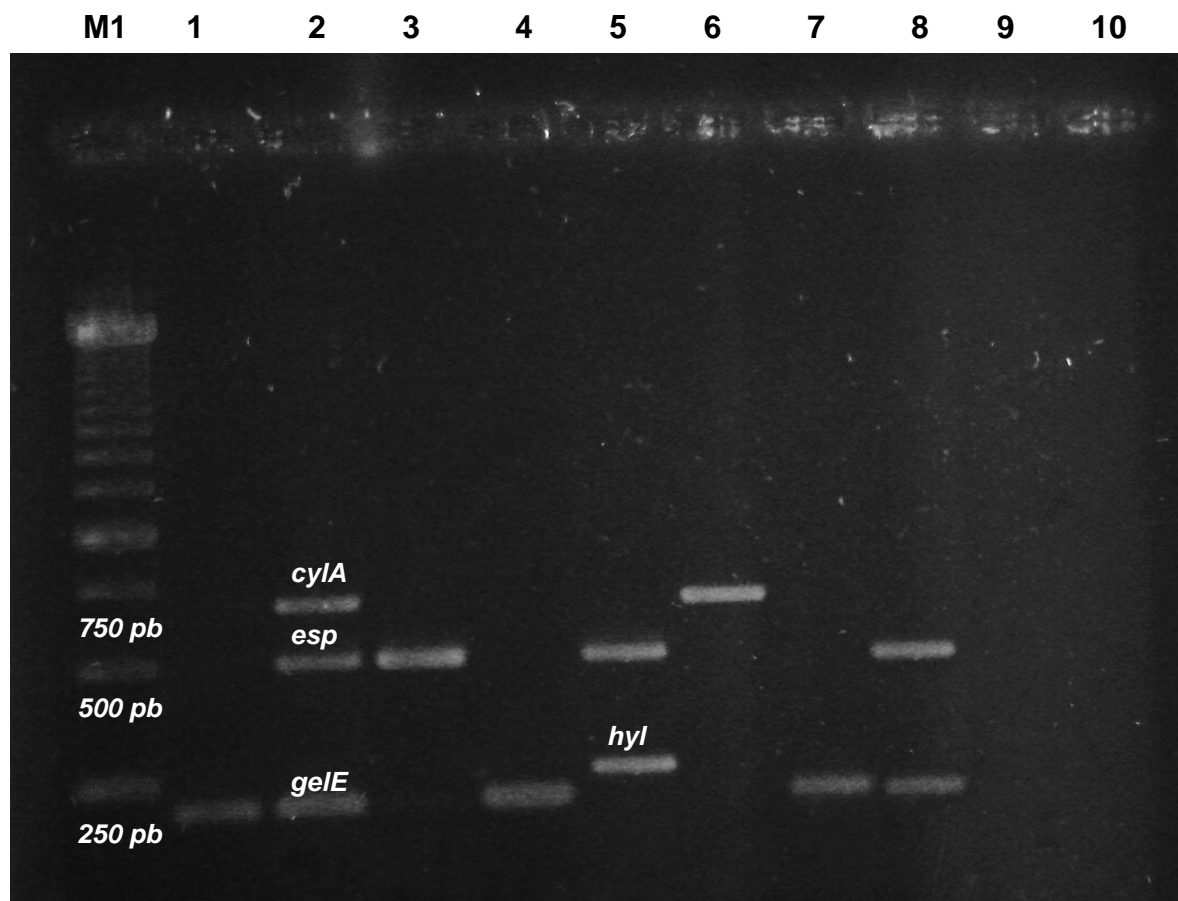
Abreviaturas: DGV: Determinantes genéticos de virulencia; DFV: Determinante fenotípico de virulencia; H.: Horas; BH+: Betahemólisis; GEL: gelatinasa; Bp: Biopelícula (+ moderada; ++ fuerte)



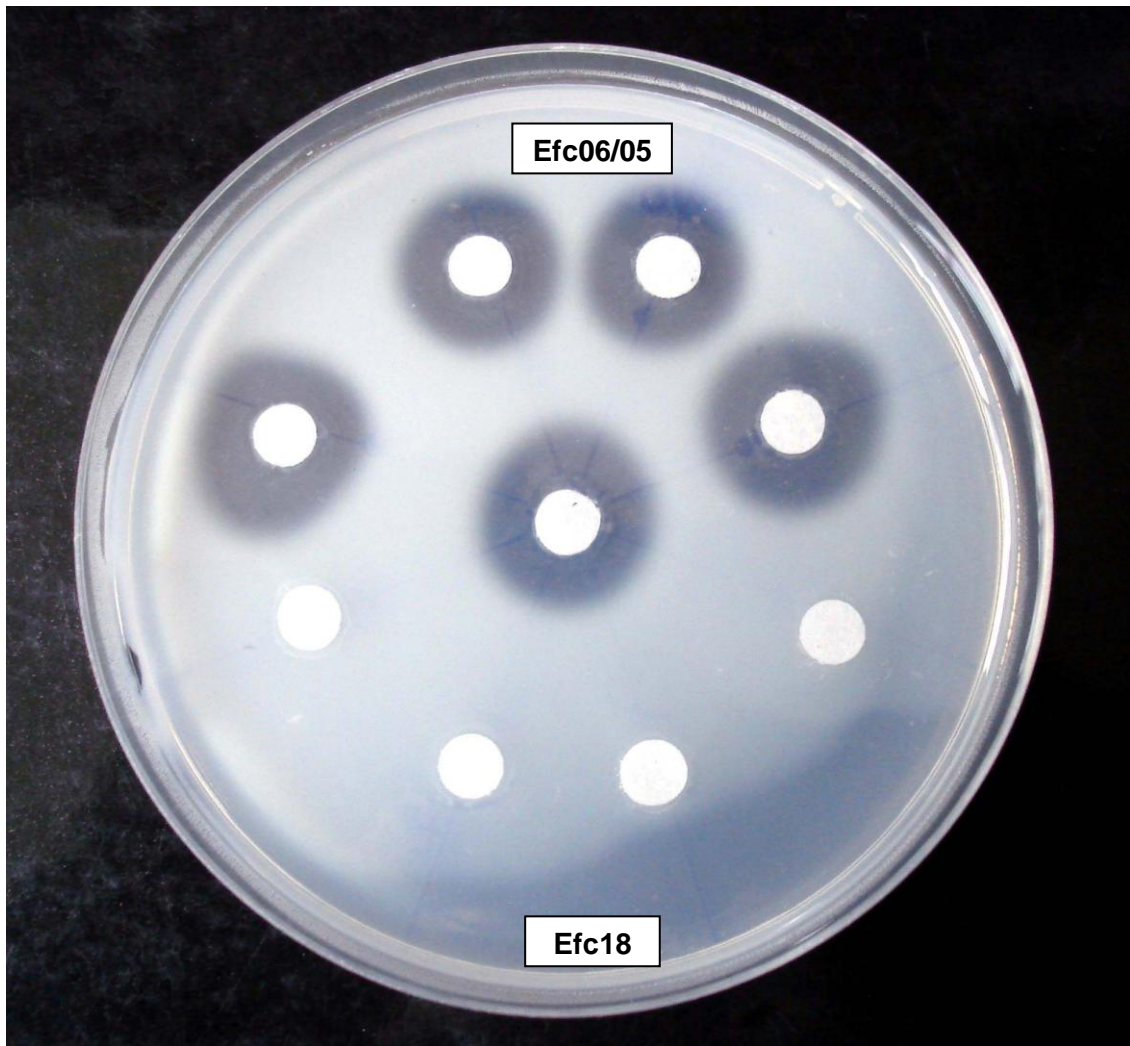
Anexo 14. PCR Uniplex con *primers* para genes *GeIE*, *hyl*, *cylA* y *esp* de *Enterococcus* según Vankerckhoven *et al* (2004). M1: Marcador molecular (250 pb); Carril1y2: control negativo (ADN sin *primers*); Carril3 y4: cepa Efc283 (*geIE*+); Carril5y6: cepa Efc283 (*esp*+); Carril7y8: cepa Efc283 (*cylA*+); Carril9y10: cepa Efm14/18 (*hyl*+).



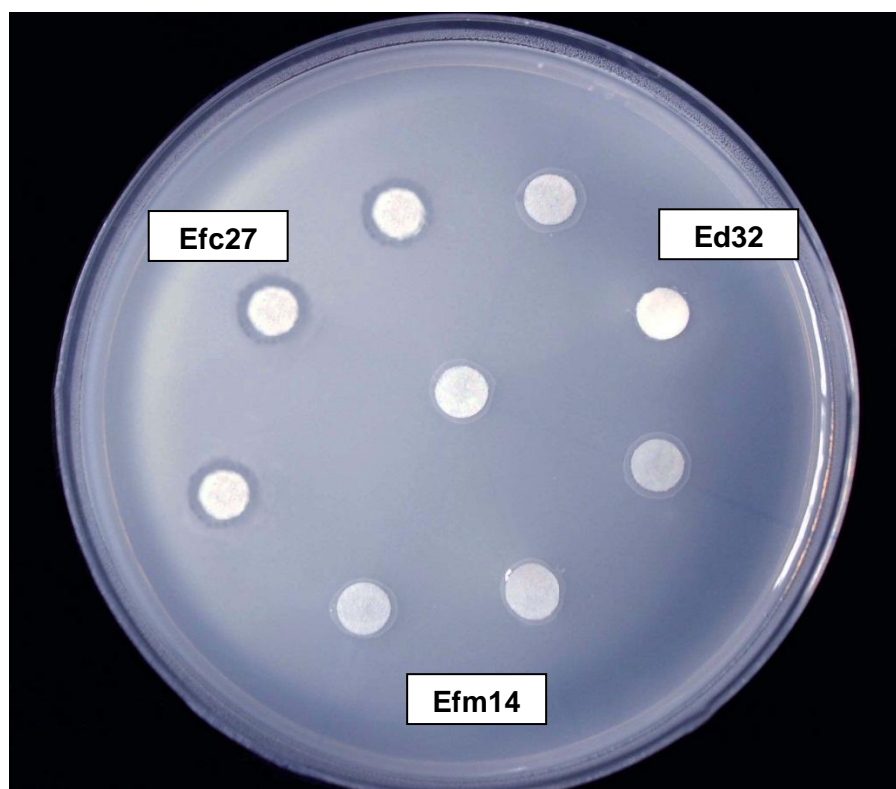
Anexo 15. Resultados de la PCR Multiplex para genes de virulencia en *Enterococcus* marinos y clínicos. M1: producto de PCR (mezcla de ADN, cepas Efc09/17 y Efm06/09). Carril1: Control negativo de PCR (sin ADN); Carril2: cepa Efc05/27; Carril3: cepa Efm02/12; Carril4: cepa Efc18; Carril5: Efm13; Carril6: cepa Ed2; Carril7: cepa Eh32; Carril8: cepaEfc08/24; Carril9: cepa Ent757-10; M2: Marcador molecular (250 pb).



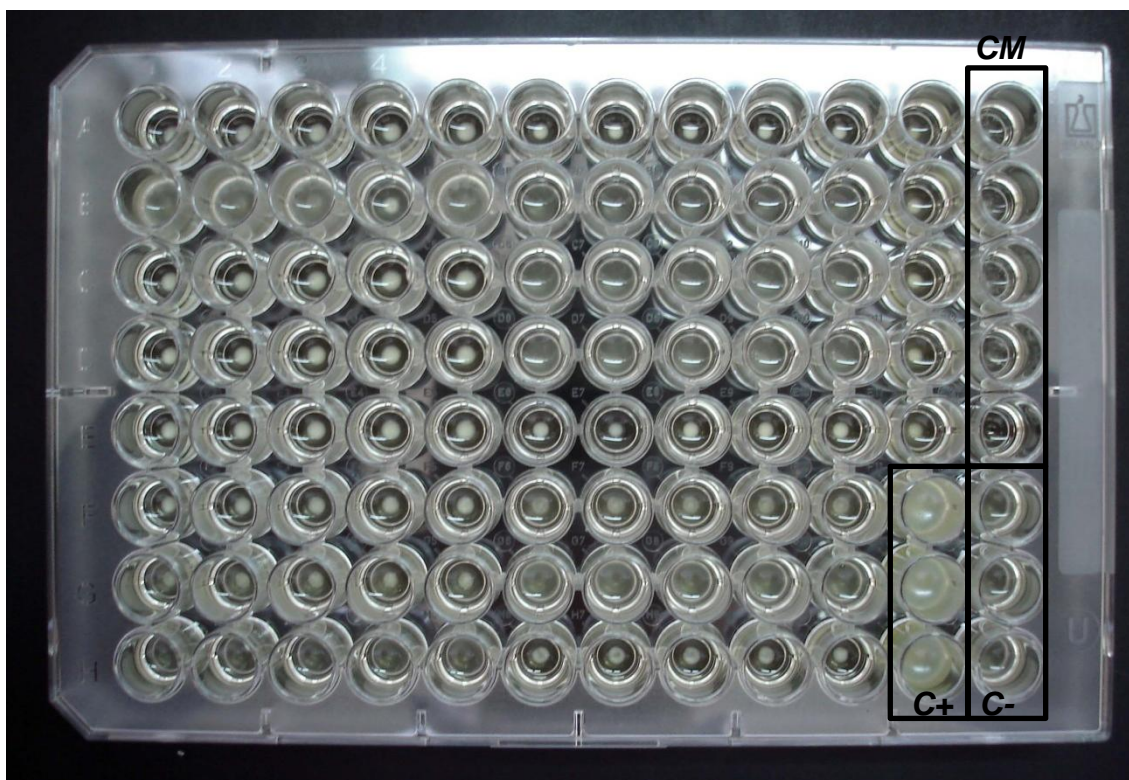
Anexo 16. Resultados de la PCR Multiplex para *Enterococcus* de origen clínico. M1: Marcador molecular (250 pb); Carril1: cepa Efm07/13; Carril2: cepa Efc09/17; Carril3: cepa Efc188-11; Carril4: cepa Eh188-4A; Carril5: Cepa Efm18/18; Carril6: cepa Efm09/22; Carril7: cepa Efc05/23; Carril8: Efm10/13; Carril9: cepa Ent189-11; Carril10: cepa Ed188-4B.



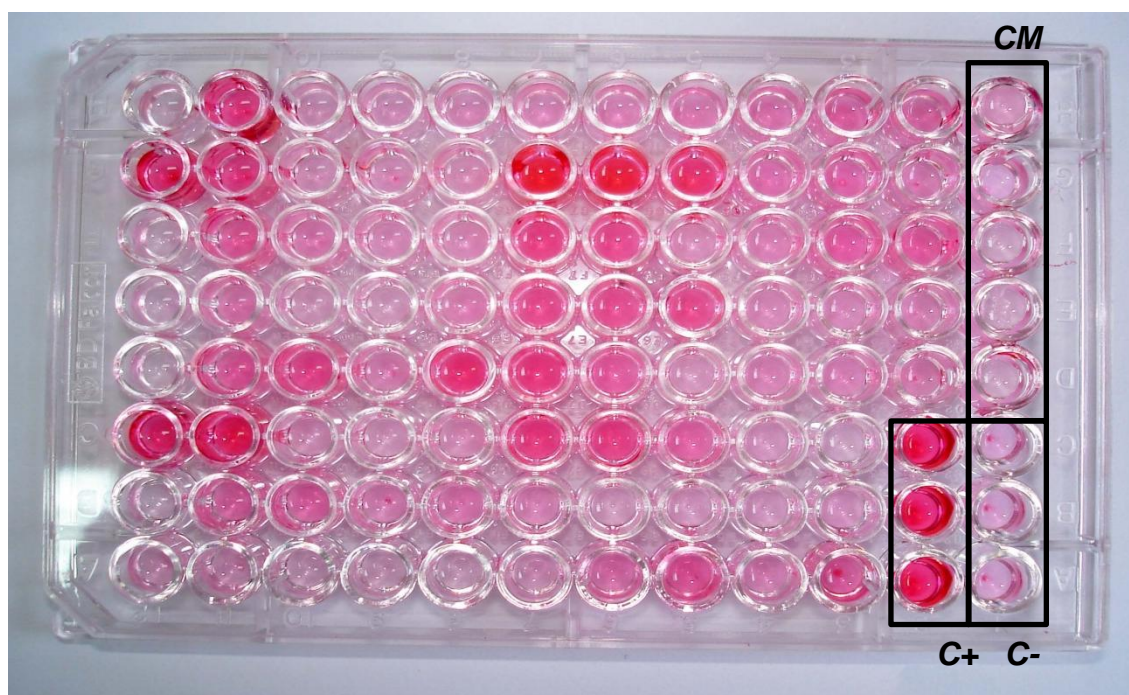
Anexo 17. Actividad Gelatinasa relativa; Hidrolisis de la Gelatina en Agar nutritivo: cepas Efc03/05 (clínico, *gelE*+) y Efc18 (marino, *gelE*-)



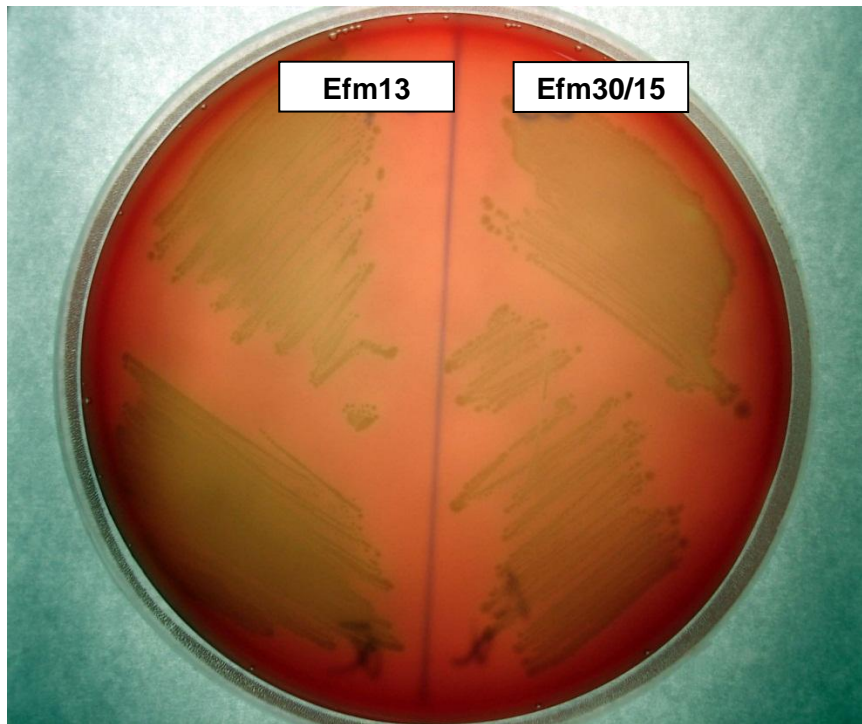
Anexo 18 y 19. Actividad Gelatinasa relativa; Hidrolisis de la Gelatina en Agar nutritivo, cepas clínicas: Efc06/05, Efm10/13 y cepas marinas: Efc27; Efm14 y Ed32 (todas *gelE*+))



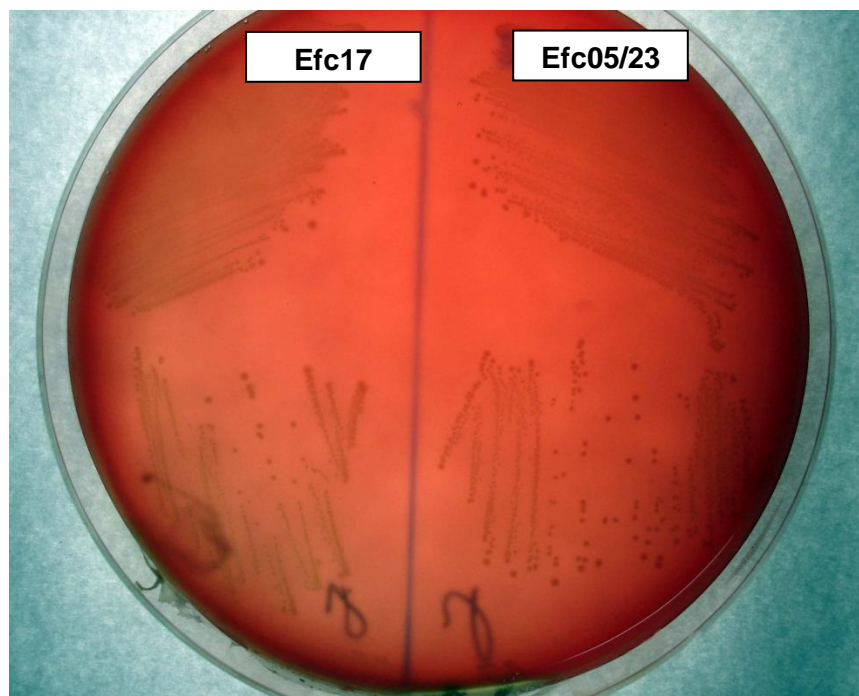
Anexo 20. Formación de biopelículas en placas de microtitulación de Poliestireno, cultivo de 24 horas (TSB + 0.75% Glucosa)



Anexo 21. Tinción de las placa de microtitulación con Safranina 0.1 (w/v) por 30 minutos y extracción del colorante con solución de etanol/ acetona (80:20 v/v); CM: control de medio; C+: *P. aeruginosa* ATCC 27853; C-: *S. aureus* ATCC 25923



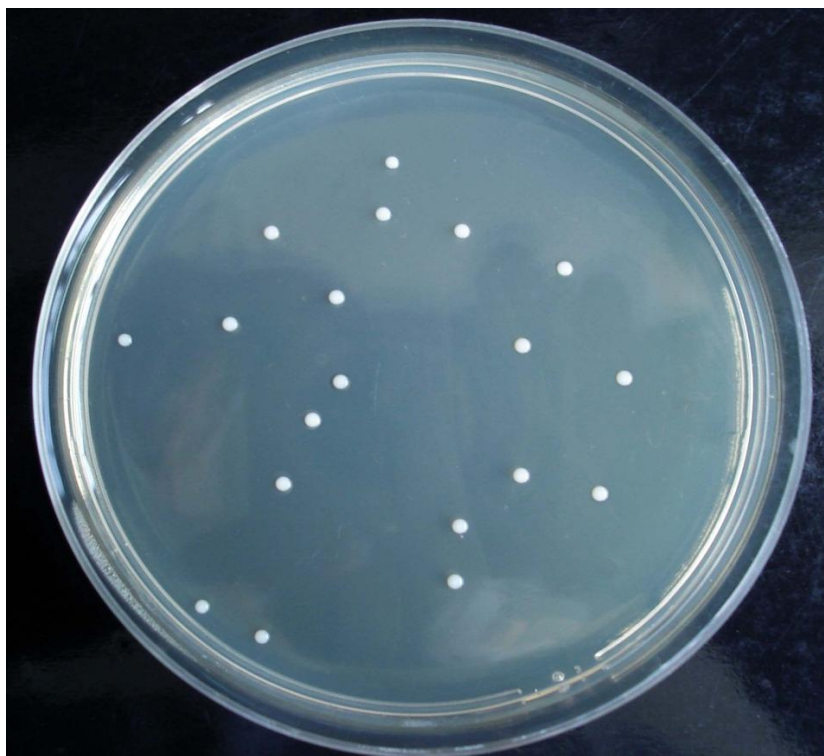
Anexo 22. Reacción de *Alpha* hemolisis (hemolisis parcial) sobre Agar Tood Hewitt suplementado con 5% de sangre humana desfibrinada. Cepas de origen marino (Efm13) y clínico (Efm30/15)



Anexo 23. Reacción de *Gamma* hemolisis (no hemolisis) sobre Agar Tood Hewitt suplementado con 5% de sangre humana desfibrinada. Cepas de origen marino (Efc17) y clínico (Efm05/23)



Anexo 24. Reacción de *Beta* hemolisis (hemolisis total) sobre Agar Tood Hewitt suplementado con 5% de sangre humana desfibrinada. Cepas de origen clínico: Efc09/17 (líquido cefalorraquídeo) y Efm22/04 (líquido ascítico).



Anexo 25. Recuento en placa de *E. faecalis* ATCC 29212 sobre agar Tood Hewitt (Dilución 10^{-6})



Anexo 26. Recuento en placa de *E. faecium* ATCC 35667 sobre agar Tood Hewitt (Dilución 10^{-5})



Anexo 27. Larva de *G. mellonella*, peso aproximado de 250-350 mg y 22-28 mm de largo para la inoculación.



Anexo 28. Larvas de *G. mellonella* sobre medio de cultivo sintético para su mantenimiento.



Anexo 29. Inoculación de cepa patógena *E. faecalis*Efc283 (Dosis 10^6 UFC/larva) en *G. mellonella*, inoculación ventral, base de la pata posterior.



Anexo 30. Grupo de larvas post inoculación; se observan procesos de melanización de la cutícula (respuesta humoral a la infección) y mortandad (ausencia de respuesta a un estímulo).